

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 9/12, 15/54 // (C12N 15/54, C12R 1:19) (C12N 9/12, C12R 1:15) (C12N 15/54, C12R 1:00)	A1	(11) 国際公開番号 WO96/30501 (43) 国際公開日 1996年10月3日 (03.10.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00761 (22) 国際出願日 1996年3月22日 (22.03.96) (30) 優先権データ 特願平7/102888 1995年3月24日 (24.03.95) JP 特願平7/177900 1995年6月9日 (09.06.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.)[JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 臼田佳弘(USUDA, Yoshihiro)[JP/JP] 川崎 寿(KAWASAKI, Hisashi)[JP/JP] 島岡 恵(SHIMAOKA, Megumi)[JP/JP] 宇多川隆(UTAGAWA, Takashi)[JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP)		(74) 代理人 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒110 東京都台東区台東1丁目30番9号 第二ツチャビル9階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 BR, CA, CN, HU, JP, KR, PL, US, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING NUCLEIC ACIDS (54) 発明の名称 核酸類の製造方法 (57) Abstract <p>A process for producing 5'-inosinic acid or 5'-guanylic acid usable in seasonings, etc. from inosine or guanosine or precursors thereof by using a microorganism which carries a DNA encoding a protein having the activity of forming 5'-inosinic acid or 5'-guanylic acid from inosine or guanosine and is capable of reproducing adenosine triphosphate (ATP); a novel protein having an inosine-guanosine kinase activity; a gene encoding this protein; a recombinant DNA containing this gene; and a microorganism transformed thereby.</p>		

(57) 要約

本発明は、イノシン又はグアノシンから5'-イノシン酸又は5'-グアニル酸を生成させる活性を有する蛋白質をコードするDNAを保持させた、アデノシン三リン酸(ATP)再生能を有する微生物を利用して、イノシン若しくはグアノシン又はこれらの前駆体から、調味料などに利用される、5'-イノシン酸又は5'-グアニル酸を製造する方法、イノシン-グアノシンキナーゼを活性を有する新規な蛋白質、それをコードする遺伝子、当該遺伝子を含有する組換えDNA、それで形質転換された微生物に関する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PR	プエルトリコ
AU	オーストラリア	EE	エストニア	LR	レソト	RO	ルーマニア
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LT	リトアニア	RS	セルビア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BB	バハマ	GB	グレートブリテン及び北アイルランド連合王国	MC	モナコ	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GE	ジョージア	MD	モルドバ	SK	スロバキア
BF	ブルキナファソ	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GU	グアム	MK	マケドニア	TD	チャド
BJ	ベナン	HN	ホンジュラス	ML	マリ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CC	ココス(キリング)諸島	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	KE	ケニア	MX	メキシコ	TA	タジキスタン
CH	スイス	KR	大韓民国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KG	キルギス	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	SZ	スワジランド
CZ	チェコ			NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム

明 細 書

核酸類の製造方法

技術分野

本発明は、イノシン又はグアノシンから5'-イノシン酸又は5'-グアニル酸を生成させる活性を有する蛋白質をコードするDNAを保持させた、アデノシン三リン酸(ATP)再生能を有する微生物を利用して、イノシン若しくはグアノシン又はそれらの前駆体から、調味料などに利用される5'-イノシン酸又は5'-グアニル酸を製造する方法に関する。

また、本発明は、イノシン-グアノシンキナーゼ活性を有する新規な蛋白質、それをコードする遺伝子、当該遺伝子を含有する組換えDNA、それで形質転換された微生物にも関する。

背景技術

従来、微生物を用いてイノシンをリン酸化し5'-イノシン酸を製造する方法として、p-ニトロフェニルリン酸を用いる方法(特公昭39-29858号)、無機リン酸を用いる方法(特公昭42-1186号、特公昭49-44350号)、アセチルリン酸を用いる方法(特開昭56-82098号)、ATPを用いる方法(特開昭63-230094号)等が開発されている。しかしながら、これらにより製造される5'-イノシン酸の蓄積は必ずしも満足すべきものではなかった。

また、ATPによりイノシンをリン酸化する方法の改良方法として、エシェリヒア・コリのイノシン-グアノシンキナーゼをコードする遺伝子を得て、遺伝子組換え技術によりイノシン-グアノシンキナーゼ活性を増強したエシェリヒア・コリ菌株を用いて、イノシンまたはグアノシンをリン酸化し5'-イノシン酸または5'-グアニル酸を製造する方法も開発されているが(WO91/08286号)、反応により消費されるATPを再生する微生物を別途培養し反応液中に存在させる必要があり、さらに効率よく5'-イノシン酸及び5'-グアニル酸を得る方法が望まれていた。

さらに、イノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子は、エシェリヒア・コリ (J. Gen. Microbiol. 135, 1263-1273 (1989)) など一部の微生物について存在が知られているのみであった。

本発明者らは、5'-イノシン酸及び／又は5'-グアニル酸のさらに効率的な製造法の開発を行っていたところ、イノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子を、反応により消費されるATPを再生するに十分な能力を有する微生物に導入することにより、簡便かつ高蓄積で5'-イノシン酸及び／又は5'-グアニル酸を製造することができることを見出した。また、エシェリヒア・コリから得られるイノシンーグアノシンキナーゼとは異なるアミノ酸配列を有する新規なイノシンーグアノシンキナーゼをも見出した。

発明の開示

本発明は、イノシン若しくはグアノシン又はそれらの前駆体から簡便かつ高蓄積で、調味料などに利用される5'-イノシン酸もしくは5'-グアニル酸を製造する方法に関する。より詳細には、本発明は反応により消費されるATPを再生するに十分な能力を有する微生物に、イノシン及び／又はグアノシンを5'-イノシン酸及び／又は5'-グアニル酸に変換する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を導入することにより、反応により消費されるATPを再生する微生物を別途培養し反応液中に存在させることなく、前記遺伝子を導入した微生物のみの存在下に簡便かつ高蓄積で、効率よく5'-イノシン酸及び／又は5'-グアニル酸を得る方法を提供するものである。

また、本発明は、エキシグオバクテリウム・アセチリカムに属する微生物などから得ることができ、かつ、イノシン及び／又はグアノシンを5'-イノシン酸及び／又は5'-グアニル酸に変換する活性を有する新規な蛋白質、それをコードする遺伝子、当該遺伝子を含有する組換えDNA、それで形質転換された微生物、及び、当該微生物を用いた5'-イノシン酸及び／又は5'-グアニル酸の製造法を提供するものである。

本発明の前記の新規な蛋白質は、既知のイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質に比べてアミノ酸配列を大幅に異にしており、新規な蛋白質である。

エシェリヒア・コリ由来のイノシンーグアノシンキナーゼは既に知られている。本発明者らは従来イノシンーグアノシンキナーゼ活性があるとは知られていなかった、エキシグオバクテリウム属に属する微生物においてもイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質を産生していることを見だし、これを単離し、コードする遺伝子をクローニングすることに成功した。これらの蛋白質は既知のものに比べてアミノ酸配列を大幅に異にしていた。

従来のイノシンーグアノシン活性を有する蛋白質と、アミノ酸配列を大幅に異にする蛋白質が同様な活性を有していることは、本発明者らの新たな知見によるものである。

すなわち、本発明は、

(1) イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子をA T P再生能を有する微生物に導入した形質転換株を、イノシン若しくはグアノシン又はこれらの前駆体、エネルギー供与体、及びリン酸供与体に接触反応させて、反応液中に5' - イノシン酸又は5' - グアニル酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする5' - イノシン酸又は5' - グアニル酸の製造法、

(2) A T P再生能を有する微生物がコリネバクテリウム属、エシェリヒア属、サッカロミセス属、スタフィロコッカス属及びキャンディダ属からなる群より選ばれる微生物である上記(1)の5' - イノシン酸又は5' - グアニル酸の製造法、

(3) A T P再生能を有する微生物がコリネバクテリウム・アンモニアゲネスである上記(1)の5' - イノシン酸又は5' - グアニル酸の製造法、

(4) イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエキシグオバクテリウム・アセチリカムに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である上記(1) ~ (3)のいずれかの5' - イノシン酸又は5' - グアニル酸の製造法、

(5) イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエシェリヒア・コリに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である上記(1) ~ (3)のいずれかの5' - イノシン酸又は

5' - グアニル酸の製造法、

(6) イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を A T P 再生能を有する微生物に導入した形質転換株、

(7) A T P 再生能を有する微生物がコリネバクテリウム属、エシェリヒア属、サッカロミセス属、スタフィロコッカス属及びキャンディダ属からなる群より選ばれる微生物である上記 (6) の形質転換株、

(8) A T P 再生能を有する微生物がコリネバクテリウム・アンモニアゲネスである上記 (6) の形質転換株、

(9) イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエキシグオバクテリウム・アセチリカムに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である上記 (6) ~ (8) のいずれかの形質転換株、

(10) イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエシェリヒア・コリに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である上記 (6) ~ (8) のいずれかの形質転換株、

(11) コリネバクテリウム・アンモニアゲネスにおいて複製可能であり、かつイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を含む組換え DNA、

(12) イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエキシグオバクテリウム・アセチリカムに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である上記 (11) の組換え DNA、

(13) イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエシェリヒア・コリに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である上記 (11) の組換え DNA、

(14) エキシグオバクテリウム・アセチリカムに属する微生物から得ることができ、かつ、以下の性質を有するイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質、

1. 作用

リン酸供与体の存在下に、ヌクレオシドにリン酸基を転移し、ヌクレオ

シドの5'-モノリン酸エステルを生成する。

2. 基質特異性

ヌクレオシド三リン酸の γ 位のリン酸基が、他のヌクレオシドに転移する。

3. 至適pH

7. 7 - 9. 9

4. pH安定性

pH 6. 7 - 12. 1

5. 至適温度

30 - 50℃

6. 金属要求性

マグネシウムイオン、マンガンイオン、コバルトイオン、又は、鉄イオン。

7. 金属イオンによる影響

銅イオン、水銀イオンで強く阻害される。

亜鉛イオン、カドミウムイオンでも阻害される。

8. Km値

Km値は、グアノシンに対して0. 03 mM、

イノシンに対して1 mM、

グアノシンを基質とした場合、ATPに対しては1. 6 mM。

9. 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約36キロダルトン。

(15) イノシン-グアノシンキナーゼ活性を有し、配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する、又は、該アミノ酸配列の一部においてアミノ酸が削除、置換若しくは追加されている蛋白質、

(16) 上記(14)又は(15)の蛋白質をコードする遺伝子、

(17) イノシン-グアノシンキナーゼを活性を有する蛋白質をコードし、配列表配列番号1に示される塩基配列を有する、又は該塩基配列を有する遺伝子とハイブリダイズすることのできる遺伝子、

に関する。

以下、本明細書においては、イノシン及びグアノシンをATPによりリン酸化し、それぞれ、5'-イノシン酸及び5'-グアニル酸を生成させる活性のことを、「イノシン-グアノシンキナーゼ活性」ともいう。また、同活性を有する蛋白質のことを「イノシン-グアノシンキナーゼ」ともいう。反応により消費されるATPを再生するに十分な能力を有する微生物のことを、「ATP生産菌」又は「ATP再生菌」ともいう。

本発明をさらに詳細に説明する。

本発明でいうイノシン-グアノシンキナーゼは、イノシン及びグアノシンをATPなどによりリン酸化し、それぞれ、5'-イノシン酸及び5'-グアニル酸を生成する反応を触媒する酵素であり、その由来は特に限定されないが微生物由来のものが好ましく、エキシグオバクテリウム・アセチリカム等に属する微生物から得られる新規な酵素のみならず、エシェリヒア・コリから得られる公知のイノシン-グアノシンキナーゼをも包含している。

本発明のエキシグオバクテリウム・アセチリカム等に属する微生物から得ることができ、かつ、イノシン-グアノシンキナーゼ活性を有する新規な蛋白質は、エキシグオバクテリウム・アセチリカムに属する微生物を培養し、得られた菌体を破碎して粗酵素抽出液を得、これから精製することにより得ることができる。これらの微生物の具体的な例としては、

エキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953
を挙げることができる。

なお、分類学上、エキシグオバクテリウム・アセチリカムは、従来、プレビバクテリウム・アセチリカムと呼ばれていた(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, P. 1301-1313 (1986))が、遺伝子解析の結果からエキシグオバクテリウム属にエキシグオバクテリウム・アセチリカムとして移すことが提案されている(Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 74-82(1994))。

イノシン-グアノシンキナーゼの精製法は、イノシン-グアノシンキナーゼ活

性を失わない方法であればいかなる方法でも用いることができるが、液体カラムクロマトグラフィーを用いる精製が一般的である。具体的には、塩化カリウムによる濃度勾配を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー、硫酸アンモニウム濃度勾配を用いた疎水カラムクロマトグラフィー、リン酸緩衝液濃度勾配を用いる吸着カラムクロマトグラフィー等を適宜組み合わせ用いればよい。

本発明のエキシグオバクテリウム・アセチリカム等に属する微生物から得ることができ、かつ、イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する酵素は、以下の性質を有している。

1. 作用

リン酸供与体の存在下に、ヌクレオシドにリン酸基を転移し、ヌクレオシドの5'-モノリン酸エステルを生成する。

リン酸供与体はヌクレオシド三リン酸であり、ATP、2'-デオキシアデノシン三リン酸、グアノシン三リン酸、2'-デオキシグアノシン三リン酸、チミジン三リン酸などを挙げることができる。

リン酸基が転移されるヌクレオシドとしては、イノシン、グアノシン、2'-デオキシグアノシンなどが挙げられる。

ヌクレオシドの5'-モノリン酸エステルは、前記ヌクレオシドの5'-モノリン酸エステルであり、例えば、5'-イノシン酸、5'-グアニル酸、2'-デオキシ-5'-グアニル酸などが挙げられる。

2. 基質特異性

ヌクレオシド三リン酸の γ 位のリン酸基が、他のヌクレオシドに転移する。

ヌクレオシド三リン酸としては、アデノシン三リン酸(ATP)、2'-デオキシアデノシン三リン酸、グアノシン三リン酸、2'-デオキシグアノシン三リン酸、チミジン三リン酸などが挙げられる。

リン酸基が転移される他のヌクレオシドとしては、イノシン、グアノシン、2'-デオキシグアノシンなどが挙げられる。

3. 至適pH

至適pHは、pH 7.7-9.9である。

4. pH安定性

pH 6.7 - 12.1 の範囲で活性は安定である。

5. 至適温度

至適温度は、30 - 50℃である。

6. 温度安定性

40℃以上では失活する。

7. 金属要求性

反応の進行には金属イオンが必要であり、マグネシウムイオン、マンガンイオン、コバルトイオン、又は、鉄イオンによって反応の進行がみられる。

8. 金属イオンによる影響

銅イオン、水銀イオンで強く阻害され、亜鉛イオン、カドミウムイオンでも阻害がみられる。

9. Km値

Km値は、グアノシンに対して0.03 mM、イノシンに対して1 mM、グアノシンを基質とした場合、ATPに対しては1.6 mMである。

10. 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約36キロダルトンである。

イノシン-グアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片は、精製した蛋白質を利用して公知の方法で得ることができる。例えば、当該蛋白質に対する抗体を作製し、染色体の遺伝子発現ライブラリーを探索する方法、精製された蛋白質のアミノ酸配列を解析し、これを基にプローブを作製し遺伝子ライブラリーを探索する方法がある。アミノ酸配列は、N末端配列の他、適当なプロテアーゼで切断して得た断片から決定した内部アミノ酸配列も利用することができる。プローブとしては、N末端アミノ酸配列あるいは内部アミノ酸配列から合成したオリゴヌクレオチド、N末端アミノ酸配列あるいは内部アミノ酸配列内で作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ・チェーン・リアクション法（PCR法）によりその領域に相当する遺

伝子を増幅したもの、N末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列を基にしてそれぞれのオリゴヌクレオチドのプライマーを合成して、N末端から内部に至る遺伝子領域をPCR法により増幅したもの等を用いることができる。また、染色体をカセットと呼ばれる二本鎖のオリゴヌクレオチドと連結し、N末端アミノ酸配列を基に合成したオリゴヌクレオチドのプライマーとカセットの配列を基に合成したプライマーを用いてPCR法により目的断片を取得する方法がある (Molecular and Cellular Probes, 6, 467 (1992))。

さらに具体的には、エキシグオバクテリウム・アセチリカムのイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子は、N末端アミノ酸配列からその領域に相当するDNA断片をPCR法により増幅し、これを基にプライマーを合成し、カセットを用いたPCR法により増幅して取得できる。

エキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 から得られる蛋白質のN末端の28個のアミノ酸の配列を解析した結果は、配列表配列番号3に示す通りである (18番目のアミノ酸は未同定)。

このN末端のアミノ酸配列においても、エキシグオバクテリウム・アセチリカムの蛋白質は、エシェリヒア・コリから得られたWO 91/08286号に記載の公知のイノシンーグアノシンキナーゼのものとは全く異なる蛋白質である。

目的遺伝子の取得には、まず、エキシグオバクテリウム・アセチリカムに属する微生物の染色体を鋳型とし、上記のN末端アミノ酸配列を基に合成したプライマーを用いてPCR法によりイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質のN末端アミノ酸配列部分をコードする遺伝子の特異的に増幅しクローニングする。プライマーとしては、塩基組成がランダムでG+C含量が50%付近であり、特殊な2次構造を形成せず、互いに相補的でない、との条件を満たすものであり、長さは通常16ないし30塩基のものがよく用いられる。プライマーの構造はN末端アミノ酸配列の両端に位置するものであり具体的に例示すると、配列表配列番号4及び5に示すようなものが挙げられる。

但し、配列番号4において、6番目のヌクレオチドはT及びCの、9番目のヌクレオチドは、A及びGの、12番目のヌクレオチドはT、C及びAの、15番

目のヌクレオチドはT、C、A及びGの混合物である。また、配列番号5において、3番目及び12番目のヌクレオチドはT及びCの、6番目のヌクレオチドはT、C、A及びGの、9番目及び15番目のヌクレオチドはA及びGの混合物である。

ついで、エキシグオバクテリウム・アセチリカムに属する微生物の染色体を適当な制限酵素により切断し、その切断物とカセットを連結したものを鋳型とし、N末端アミノ酸配列部分をコードする遺伝子の配列を基に合成したプライマーとカセットを基にしたプライマーを用いてPCR法によりイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質の構造遺伝子部分あるいはその上流領域を含むDNA断片を特異的に増幅しクローニングする。プライマーとしては上記の条件を満たすものであれば用いることができるが、具体的に例示すると配列表配列番号6及び7に示すようなものを使用できる。

遺伝子のクローニングに使用するベクターとしては宿主として使用するエシェリヒア・コリで自律複製できるベクターであればいかなるものでも構わない。例えば、pUC19、pHSG298、pHSG398、pBR322等が用いられる。作製した組換えDNAの受容菌としてはベクターの複製に好適なものであればいずれの菌株でもよく、例えばHB101、JM109、DH5等のエシェリヒア・コリ菌株が用いられる。

ベクターに挿入されたDNA断片の塩基配列を決定することにより、該DNA断片上に存在する、イノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子の塩基配列及びそれがコードしている蛋白質のアミノ酸配列を決定することができる。かくして明らかとなったエキシグオバクテリウム・アセチリカムATCC953のイノシンーグアノシンキナーゼの塩基配列及びアミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号1及び2に示す。

本蛋白質は303個のアミノ酸からなり、その分子量は約32.5キロダルトンである。

本発明の蛋白質は配列表の配列番号2で示されるもののみならず、エキシグオ

バクテリウム・アセチリカムに属する微生物から得ることができ、かつ、イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有するものであれば、他の天然の変異体をも包含する。

また、イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有するものであれば、このアミノ酸配列の一部が置換されたものであってもよいし、一部が削除しているものであってもよいし、それらにさらにアミノ酸が付加されたものであってもよいし、また、蛋白質が一部修飾されたものであってもよいことは当業者には明らかである。

また、イノシンーグアノシンキナーゼをコードしている限り、上記のエキシグオバクテリウム・アセチリカム由来の遺伝子に代えて、該遺伝子とハイブリダイズすることができる遺伝子も使用することができる。

エキシグオバクテリウム・アセチリカム由来の遺伝子とハイブリダイズすることができる遺伝子は、以下のような菌株から取得することができる。

エキシグオバクテリウム・アウランティアカム ATCC 35652

クルチア・ギブソニ ATCC 43195

クルチア・ゾプフィ JCM 6101

このような遺伝子は、相同性を利用した公知の方法で取得することができるが、具体的には以下に述べる方法を用いることができる。

まず、上記微生物の染色体DNAを適当な制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動を行う。切断断片を適当な転写フィルターにブロッティングし、エキシグオバクテリウム・アセチリカム由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーション法により相同性を持つ断片を検出し、大きさを決定する。

ついで、制限酵素で切断した断片のうち目的とする大きさのものを精製する。精製法は、ショ糖密度勾配遠心法、ガラスパウダーによるアガロースゲルからの回収等が一般的である。精製した断片は、適当なベクターに連結し、エシェリヒア・コリ菌株に形質転換する。これら形質転換体の中からコロニーハイブリダイゼーション法により目的とするイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子を含む断片を持つ菌株を選択できる。

本発明では、前記した新規なイノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子に代えて、公知のイノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子も使用することができる。

公知のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子としては、エシェリヒア・コリに由来するものがあり(J. Gen. Microbiol., 135, 1263-1237 (1989))、例えば、以下のような菌株から取得することができる。

エシェリヒア・コリ ATCC 27325

公知のイノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子は、公知の方法により取得することができるが、以下に述べる方法により、エシェリヒア・コリ ATCC 27325の染色体DNAから本発明で使用するすることができるイノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子を取得することもできる。

まず、配列表配列番号10に示すエシェリヒア・コリ由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子の配列(WO 91/08286号)をもとにプライマーを合成する。プライマーとしては、塩基組成がランダムでG+C含量が50%付近であり、特殊な2次構造を形成せず、互いに相補的でない、との条件を満たすものであり、長さは通常16ないし30塩基のものがよく用いられる。プライマーの配列はイノシンーグアノシンキナーゼ構造遺伝子の両端に位置するものであり、具体的に例示すると、配列表配列番号11及び12に示すようなものが挙げられる。

ついで、本プライマーとエシェリヒア・コリ染色体DNAからポリメラーゼ・チェーン・リアクション法(PCR法)によりイノシンーグアノシンキナーゼ構造遺伝子を増幅しクローニングすることができる。ベクターとしてはエシェリヒア・コリ由来のベクター、例えば、pUC19、pBR322等が用いられる。作成した組換えDNAの受容菌としては、ベクターの複製に好適なものであればいずれの菌株でもよく、例えばHB101、JM109、DH5等のエシェリヒア・コリ菌株が用いられる。

かくして、エシェリヒア・コリのイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子を含むDNA断片が挿入されたプラスミドが得られる。

なお、エキシグオバクテリウム・アセチリカムの場合と同様に、イノシンーグアノシンキナーゼをコードする限り、エシェリヒア・コリ由来の該遺伝子と相同性を有し、ハイブリダイズすることができる遺伝子を取得し、使用することもできる。

上記のようにして得られるイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片は、他の適当なベクターに再度組換えるか複製起点を挿入した後、ATP生産能を有する宿主細胞に導入させる。

すなわち、宿主細胞としては、反応により消費されるATPをATP前駆体から再生するに十分な能力(ATP生産能又はATP再生能という。)を有する微生物(ATP生産菌又はATP再生菌という。)が用いられる。

本発明でいうATP再生能を有する微生物としては、イノシン及び／又はグアノシンを5'-イノシン酸及び／又は5'-グアニル酸に変換する反応により消費されるATPを当該反応系においてATP前駆体から再生し、当該反応を進行することができる能力を有する微生物であれば特に制限はないが、例えば、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、スタフィロコッカス属、サッカロミセス属、又はキャンディダ属に属する微生物を挙げることができる。特に、ATP再生能が高いコリネバクテリウム・アンモニアゲネスに属する微生物が好適に用いられる。なお、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスは、従来ブレバクテリウム・アンモニアゲネスとして分類されていたものである。

本発明で使用されるATP再生能を有する微生物の具体的な例としては、以下のような菌株及びこれから誘導される変異株が挙げられる。

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (旧名称: ブレバクテリウム・アンモニアゲネス) ATCC 6872

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (旧名称: ブレバクテリウム・アンモニアゲネス) ATCC 21295

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス（旧名称：ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス） ATCC 21477

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13020

コリネバクテリウム・グルタミカム（旧名称：ブレビバクテリウム・フラバム）
ATCC 14067

コリネバクテリウム・グルタミカム（旧名称：ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム） ATCC 13869

エシェリヒア・コリ B（ATCC 11303）、

サッカロミセス・セレピシェ ATCC 20018、

スタフィロコッカス・オーレウス ATCC 4012、

キャンディダ・ゼイラノイデス ATCC 20356、

キャンディダ・サイクロフィラ（旧名称：トルロブシス・サイクロフィラ）
ATCC 22163

さらに、ATP再生能を有する微生物としては、イノシン及び／又はグアノシンの分解活性が弱いあるいは欠失したものが望ましい。このような微生物の例として、上記の微生物の中からは、

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21295

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21477

が挙げられる。

本発明のATP再生能を有する微生物として、ATP再生能と共にイノシン又はグアノシンの前駆体からイノシン又はグアノシンの生産能を有するATP再生菌を使用することもできる。この場合には、イノシン又はグアノシンに代えてこれらの前駆体から5'-イノシン酸又は5'-グアニル酸を製造することができ、そのような前駆体としては、グルコース、シュクロース、蔗糖蜜、澱粉加水分解物などの糖類、酢酸などの有機酸類、グリセロール、エタノールなどのアルコール類が挙げられる。

イノシン又はグアノシンの生産能を有するATP再生菌としては、例えば、

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21478

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21479

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21480

などが挙げられる。

前記したイノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子を組み込むベクターとしては、受容菌であるATP再生菌において複製可能なものであれば特に制限はないが、例えば、ATP再生菌としてコリネバクテリウム属細菌を用いる場合には、当該細菌で自立複製できるプラスミドを挙げることができる。具体的に例示すれば、pAM330（特開昭58-67699号）、pHM1519（特開昭58-77895号）pAJ655、pAJ611、pAJ1844（以上、特開昭58-192900号）、pCG1（特開昭57-134500号）、pCG2（特開昭58-35197号）pCG4、pCG11（特開昭57-183799号）、pGA1（Gene, 107, 69（1991））、pHK4、pHC4（特開平5-7491号）等が挙げられる。また、ATP再生菌としてエシエリヒア・コリを用いる場合には、例えば、ColE1系プラスミド、P15A系プラスミド、R因子系プラスミド、F因子系プラスミド、ファージ系プラスミド等を用いることができる。具体的に例示すれば、pBR322（Gene, 2, 95（1977））、pUC19（Gene, 33, 103（1985））、pACYC184（J. Bacteriol, 134, 1141（1978））、pSC101（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 3240（1973））等が挙げられる。ATP再生菌としてサッカロミセス・セレビシエを用いる場合には、YEp系プラスミド、YCp系プラスミド、YRp系プラスミド、YLp系プラスミド等を用いることができる。具体的には、YEp24、YRp7、YCp50等が挙げられる。ATP再生菌としてスタフィロコッカス・オーレウスを用いる場合には、pRIT5（EMBO J., 4, 1075（1985））等を用いることができる。

イノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子を高頻度に発現させるためにプロモーター配列およびSD配列をイノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子上流に配置させることが好ましい。これらの配列を導入する方法としては特に制限はないが、プロモーター配列およびSD配列をもつベクターを用い、

それら配列の下流に前記遺伝子を挿入する方法、あるいはプロモーターおよびSD配列を合成し、前記遺伝子上流に挿入する方法を用いることができる。プロモーター配列およびSD配列としては特に制限はないが、ATP再生菌としてコリネバクテリウム属細菌を用いる場合には、エシェリヒア・コリ由来のtac、lac、trpプロモーター、あるいはコリネバクテリウム属細菌由来のtrpプロモーター(Gene, 53, 191(1987))、fdaプロモーター(Mol. Microbiol., 3, 1625 (1989))、ppcプロモーター(Gene, 77, 237 (1989))、lysCプロモーター(Mol. Microbiol., 5, 1197 (1991))、gdhプロモーター(Mol. Microbiol., 6, 317 (1992))、csp1、csp2プロモーター(特表平6-502548号)を例示することができる。ATP再生菌としてエシェリヒア・コリを用いる場合には、エシェリヒア・コリ由来のtac、lac、trpプロモーター、λファージのP_Lプロモーターを例示することができる。ATP再生菌としてサッカロミセス・セレビシエを用いる場合には、ADH1、ENO1、PGK1、GAP-DH、GAL1、GAL10、GAL7、PHO5、MFα1プロモーターを例示することができる。ATP再生菌としてスタフィロコッカス・オーレウスを用いる場合には、spaプロモーター(J. Bacteriol., 159, 713 (1984))を例示することができる。

本発明のイノシン及び／又はグアノシンを5'-イノシン酸及び／又は5'-グアニル酸に変換する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を含む組換えDNAをATP再生能を有する微生物に導入する方法としては特に制限はなく、通常の方法により行うことが出来る。例えば、ATP再生菌として、コリネバクテリウム属細菌を用いる場合には、プロトプラスト法(特開昭57-183799号)、電気穿孔法(特開平2-207791号)が特に有効である。ATP再生菌としてエシェリヒア・コリを用いる場合には、塩化カルシウム法(J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))、Hanahan法(J. Mol. Biol., 166, 557 (1983))、SEM法(Gene, 96, 23 (1990))、Chungらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 2172 (1989))、電気穿孔法(Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988))などを用いることができる。枯草菌について報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法(C. H. Gene, 1, 153 (1977))がある。ある

いは、枯草菌、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979)、Nature, 274, 398 (1978)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)) も応用できる。ATP再生菌としてサッカロミセス・セレピシエを用いる場合には、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 1929 (1978))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol., 153, 163 (1983))、電気穿孔法 ("Methods in Enzymology" 194, 182 (1991)) などによって、組換え遺伝子の導入を行うことができる。ATP再生菌としてスタフィロコッカス・オーレウスを用いる場合には、プロトプラスト法によって組換え遺伝子の導入を行うことができる (Plasmid, 5, 292 (1981))。

プロトプラスト法では上記の枯草菌において使用されている方法でも充分高い頻度を得ることができるが、特開昭57-183799号公報に開示されるように、コリネバクテリウム属細菌細胞のプロトプラストをポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの一方及び二価金属イオンに接触させた状態でDNAを取り込ませる方法も利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68 (セルバ社製) などの添加によってもDNAのとり込みを促進させることができる。

また、電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照) によっても組換えDNAを受容菌へ導入することもできる。本発明の実施例で用いた形質転換の方法は電気パルス法である。

さらに、イノシンーグアノシンキナーゼの遺伝子をATP再生能を有する微生物の染色体DNAに組み込むこともできる。染色体遺伝子に組み込む方法としては特に制限はないが、例えば、プラスミドベクターにコリネバクテリウム属細菌由来の温度感受性複製起点とイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子とクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカールとを挿入して組換えDNAを調製し、

この組換えDNAでコリネバクテリウム属細菌を形質転換する。続いて、形質転換体を薬剤を含む培地でかつ温度感受性複製起点が機能しない温度で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる (J. Bacteriol., 162, 1196 (1985)、特開平5-7491号公報)。あるいは、コリネバクテリウム属細菌由来の転移因子を利用する方法も適用可能である ("Mobile Genetic Elements", Academic Press, New York (1983)、WO 93/18151号)。

このようにして得られたイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を導入した本発明の形質転換体を、炭素源、窒素源、無機塩類、さらに必要に応じて有機微量栄養素を含有する通常の培地で培養することによりイノシンーグアノシンキナーゼ活性を高レベルで発現させることができる。

炭素源としては、グルコース、シュクロース、蔗糖蜜、澱粉加水分解物などの糖類の他、酢酸、クエン酸などの有機酸類、エタノールなどのアルコール類が使用され、窒素源としては、尿素、アンモニウム塩、アンモニア水、アンモニアガスなどが使用される。無機塩類としては、リン酸塩、カリウム塩、マグネシウム塩、鉄塩、マンガン塩などが使用される。有機微量栄養素としては、アミノ酸類、ビタミン類、脂肪酸類、核酸類、その他これらのものを含有するペプトン、酵母エキス、大豆蛋白加水分解物などが使用される。

培養は、温度25ないし37℃にて、pHを5ないし9に制御しつつ、10ないし40時間好氣的条件下にて行う。

培養終了後、培養液中に生成蓄積したイノシンーグアノシンキナーゼ活性を測定することにより力価を確認する。活性測定は、遠心分離などの操作により培養物から回収した菌体を、超音波処理、フレンチプレス処理などにより破碎した後遠心分離して菌体残渣を除去し、ゲル濾過にて低分子物質を除いたものを用いて、Molec. Gen. Genet. 143, 85-91 (1975)記載の方法等により行うことができる。

かくして得られたATP前駆体からATPを生合成する能力を有し、イノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子を保持する微生物の培養物、該培養物

より分離した菌体もしくは該菌体の処理物をイノシン若しくはグアノシン又はこれらの前駆体、エネルギー供与体及びリン酸基供与体に接触反応させることにより、反応液中に5'-イノシン酸もしくは5'-グアニル酸を生成することができる。培養物からの菌体の分離は遠心分離機等により行うことができ、また、菌体の処理物としては、アセトン処理菌体、固定化菌体、破砕した菌体などが挙げられる。

本発明において好適に用いられる材料物質としては以下のものを挙げることができる。

イノシン又はグアノシンの前駆体としては、グルコース、シュクロース、廃糖蜜、澱粉加水分解物などの糖類、酢酸などの有機酸類、グリセロール、エタノールなどのアルコール類などが使用される。

エネルギー供与体としては、グルコース、シュクロース 澱粉加水分解物、廃糖蜜などの糖類の他、酢酸、クエン酸などの有機酸類、エタノールなどのアルコール類が使用される。

リン酸供与体としては、オルトリン酸、ピロリン酸、ポリリン酸、トリポリリン酸、ポリメタリン酸、ヘキサメタリン酸等の無機リン酸およびその塩類のほか、フェニルリン酸、アセチルリン酸、カルバミルリン酸等の有機リン酸を用いることができる。

また、反応液中に、ATP前駆体、界面活性剤、金属イオン等を添加することにより、反応の効率が改善される場合がある。

ATP前駆体としては、アデノシン二リン酸、アデニル酸、アデノシン、アデニン、アデニン鉱酸塩、及びリボ核酸の加水分解液などが使用できる。

界面活性剤は、カチオン系、アニオン系もしくは両性のいずれでも、イノシンもしくはグアノシンのリン酸化を促進するものであればよい。また、金属イオンとしては、マグネシウムイオン、マンガンイオン等が適宜使用される。

なお、イノシン-グアノシンキナーゼをATP再生菌と組合せて使用する従来のリン酸化反応においては、反応系に有機溶剤を添加するのが一般的であったが

(特開昭63-230094号、WO91/08286号)、本反応系では有機溶媒を添加しない場合でも効率的に反応が進行する。

反応は温度25ないし37℃にてpHを6ないし8に制御しつつ、10ないし30時間好気条件下にて行う。

反応終了後、反応液中に生成蓄積した5'-イノシン酸もしくは5'-グアニル酸は、イオン交換樹脂処理、晶析等の方法により採取することができる。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例 1

(エシェリヒア・コリ由来のイノシン-グアノシンキナーゼ遺伝子発現プラスミドの構築とコリネバクテリウム・アンモニアゲネスへの導入)

(1) PCR法によるイノシン-グアノシンキナーゼ遺伝子の増幅とクローニング
エシェリヒア・コリ由来のイノシン-グアノシンキナーゼ遺伝子の両端に位置し、それぞれ制限酵素 Pst I、Hind III 切断部位を有する配列表配列番号 11 及び 12 に示すオリゴヌクレオチドをホスホロアミダイド法により DNA 合成装置 (アプライドバイオシステム社製モデル 394) を用いて合成した。

プライマーとして該オリゴヌクレオチド 0.25 μ mol、鋳型として齊藤、三浦の方法 (Biochem. Biophys. Acta., 72, 619, (1963)) により調製したエシェリヒア・コリ W3110 (ATCC 27325) の染色体 DNA 0.1 μ g 及びタック DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) 2.5 ユニットを、dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 200 μ M、塩化カリウム 50 mM、塩化マグネシウム 1.5 mM 及びゼラチン 0.0001% を含有する 10 mM N-トリス (ヒドロキシメチル) メチル-2-アミノエタン (以下、トリス) -塩酸緩衝液 (pH 8.3) 0.1 ml に添加し、94℃を30秒、55℃を30秒、72℃

を30秒のサイクルを25回繰り返すPCR法を行った。反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、目的とするDNA断片をガラスパウダー（宝酒造社製）を用いて回収した。該DNA断片約2 μ g及び制限酵素PstIおよびHindIIIそれぞれ20ユニットを10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウム及び1mMジチオスレイトールを含有する50mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）に混合し、温度37℃で2時間反応させて消化液を得、該液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈澱した。

プラスミドpHSG298（宝酒造社製）DNA1 μ g及び制限酵素PstIおよびHindIII20ユニットを10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウム及び1mMジチオスレイトールを含有する50mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）におおの混合し、温度37℃で2時間反応させた。反応終了液を常法によりフェノール抽出処理し、エタノール沈澱処理してPstIおよびHindIIIで消化されたプラスミドpHSG298を得た。このPstIおよびHindIIIで消化されたpHSG298を0.1 μ g、PstIおよびHindIIIで消化されたPCRによる増幅断片0.5 μ g及びT4DNAリガーゼ1ユニット（宝酒造社製）を6.6mM塩化マグネシウム、10mMジチオスレイトール及び10mMATPを含有する66mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）に添加し、温度16℃で8時間反応し、DNAを連結させた。次いで該DNA混合物で、常法によりエシェリヒア・コリ JM109（宝酒造社製）を形質転換し、これを100 μ g/mlのカナマイシンを含む寒天培地上にまき、形質転換体を得た。

得られた形質転換体からMolecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, p.1.25(1989)) 記載のアルカリ溶菌法によりベクターDNAを調製し常法に従ってアガロースゲル電気泳動を行うことにより、プラスミドpHSG298にイノシグアノシンキナーゼ遺伝子が挿入された組換えプラスミドを選択した。このプラスミドをpIGK-1と命名した。

(2) エシェリヒア・コリ trpプロモーターの挿入

5' - 端、3' - 端にそれぞれ制限酵素 B a m H I、P s t I 切断部位を有する配列表配列番号 13 に示すオリゴヌクレオチドおよび相補配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。得られたオリゴヌクレオチド各々 1 μ g を混合し、100℃、5 分処理の後、徐冷してアニールさせた。このオリゴヌクレオチド溶液と B a m H I 20 ユニットを 10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化カリウム及び 1 mM ジチオスレイトールを含有する 20 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.5) におのおの混合し、温度 30℃ で 2 時間反応させ消化液を得、該液をフェノール抽出及びエタノール沈澱した。得られた沈澱物を前項 (1) と同様に P s t I で消化し、消化液をフェノール抽出及びエタノール沈澱した。かくして B a m H I および P s t I で切断されたエシェリヒア・コリ t r p プロモーターを含む DNA 断片を得た。

前項 (1) で得られたイノシングアノシンキナーゼ遺伝子を含む組換えプラスミド p I G K - 1 1 μ g を同様に B a m H I および P s t I で消化し、反応終了液を常法によりフェノール抽出処理し、エタノール沈澱処理して B a m H I および P s t I で消化されたプラスミドを得た。この B a m H I および P s t I で消化された p I G K - 1 を 0.1 μ g、上記で得た B a m H I および P s t I で消化された断片 0.5 μ g 及び T4 DNA リガーゼ 1 ユニット (宝酒造社製) を 6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール及び 10 mM A T P を含有する 66 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.5) に添加し、温度 16℃ で 8 時間反応し、DNA を連結させた。次いで該 DNA 混合物で、エシェリヒア・コリ J M 109 (宝酒造社製) を形質転換し、これを 100 μ g / ml のカナマイシンを含む寒天培地上にまき、形質転換体を得た。

得られた形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミド DNA を調製し常法に従ってアガロースゲル電気泳動を行うことにより、プラスミド p I G K - 1 にエシェリヒア・コリの t r p プロモーター DNA 断片を含む組換えプラスミドを選択し、これを p I G K - 2 と命名した。

(3) コリネバクテリウム由来複製起点の挿入

前項 (2) で得られたイノシングアノシンキナーゼ遺伝子および t r p プロモ

ーターを含む組換えプラスミド p I G K - 2 1 μ g を前項 (2) の反応組成で B a m H I 消化し、フェノール抽出処理し、エタノール沈澱を行なった。B a m H I 消化で消化されたプラスミド p I G K - 2 は、再結合するのを防止するため、Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, pl.60 (1989)) の方法でバクテリアル・アルカリフォスファターゼ処理により DNA 断片の脱リン酸化を行い、フェノール抽出処理、エタノール沈澱を行なった。

一方、コリネバクテリウム・グルタミカム由来の複製起点を含む領域を p H S G 3 9 9 (宝酒造社製) に挿入して得たプラスミド p H C 4 (特開平 5 - 7 4 9 1 号) 1 μ g 及び制限酵素 K p n I 10 ユニットを 10 mM 塩化マグネシウム及び 1 mM ジチオスレイトールを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (p H 7. 5) に加え、37℃で2時間反応し、該液をフェノール抽出及びエタノール沈澱した。この K p n I で切断された p H C 4 の平滑末端化を DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて指定された方法にて行い、ついでリン酸化済 B a m H I リンカー (宝酒造社製) を T 4 ポリヌクレオチドリガーゼを用いて連結した。これによりコリネバクテリウム・グルタミカム由来のプラスミドの複製起点を含む領域の両側に B a m H I 切断部位を持つ DNA 断片を得た。この DNA 断片と 20 ユニットの B a m H I を前項 (2) に記載した緩衝液中で混合し、温度 30℃で2時間反応した。反応液をフェノール抽出及びエタノール沈澱した。

上記で得られた B a m H I 消化で消化されたプラスミド p I G K - 2 0. 1 μ g および B a m H I で消化されたプラスミド p H C 4 由来の DNA 断片 0. 2 μ g 及び T 4 DNA リガーゼ (宝酒造社製) 1 ユニットを前項 (1) 記載の緩衝液中で混合し、温度 16℃で8時間反応し、DNA を連結させた。次いで該 DNA 混合物で、エシェリヒア・コリ JM 109 (宝酒造社製) を形質転換し、これを 100 μ g / m l のカナマイシンを含む L 寒天培地上にまき、形質転換体を得た。

得られた形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミド DNA を調製し常法に従ってアガロースゲル電気泳動を行うことにより、プラスミド p I G K - 2 にコリネバクテリウム属細菌内で自律複製可能な DNA 断片を含む組換えプラスミ

ドを選択し、これを p I G K - 3 と命名した。

なお、プラスミド p H C 4 を保持するエシェリヒア・コリ A J 1 2 6 1 7 は、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 1 号（郵便番号 3 0 5）工業技術院生命工学工業技術研究所において平成 3 年 4 月 2 4 日付で受託番号 F E R M P - 1 2 2 1 5 のもとに寄託され、平成 3 年 8 月 2 6 日付でブタベスト条約に基づく寄託に移管され受託番号 F E R M B P - 3 5 3 2 が付与されている。

(4) p I G K - 3 の A T C C 2 1 4 7 7 株への遺伝子導入

(3) で得られた p I G K - 3 0.1 μ g を電気パルス法を用いた形質転換の常法（特開平 2 - 2 0 7 7 9 1 号公報）に従い、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス A T C C 2 1 4 7 7 に導入した。これをポリペプトン 1 %、酵母エキス 1 %、塩化ナトリウム 0.5 %、グルコース 0.5 % 及びカナマイシン 5 0 μ g / ml から成る寒天培地上にまき、形質転換体 A T C C 2 1 4 7 7 / p I G K - 3 を得た。

(5) 組換え体のイノシンーグアノシンキナーゼ活性の測定

(4) で得られたコリネバクテリウム・アンモニアゲネス A T C C 2 1 4 7 7 / p I G K - 3 をポリペプトン 1 %、酵母エキス 1 %、グルコース 5 %、リン酸二水素カリウム 0.4 %、硫酸マグネシウム 0.1 %、硫酸アンモニウム 0.5 %、尿素 0.5 %、硫酸第一鉄 0.001 %、硫酸マンガン 0.001 %、チアミン塩酸塩 0.005 g / l、パントテン酸カルシウム 0.01 g / l、ビオチン 3 0 μ g / l、アデニン 0.05 %、及びカナマイシン 5 0 mg / l から成る培地（pH 7.2）5 0 ml に接種し、32℃で 2 4 時間培養した。該培養液を常法に従って遠心分離し、菌体を集めた。

この菌体を 0.9 % 塩化ナトリウム水溶液で懸濁し、遠心分離する操作を 2 回繰り返し菌体を洗浄した。該菌体を 2 0 % グリセロール、1 0 0 mM 塩化カリウム、5 mM 2 - メルカプトエタノールを含む 5 0 mM トリスー塩酸緩衝液（pH 7.9）に懸濁し、1 5 0 W、2 0 分超音波処理（K u b o t a 社製）した後、1 5, 0 0 0 r p m、3 0 分遠心分離して上清を得た。この上清をセファデクス

G-25 (Pharmacia社製) カラムクロマトグラフィーに供し、低分子量物質を除いたものを粗酵素液とした。

得られた粗酵素液のイノシンーグアノシンキナーゼ活性を100mM Tris、10mM塩化マグネシウム、1mMATP、250mM塩化カリウム、0.2mM [8-¹⁴C]-イノシンからなる反応組成液をもちいて測定した。粗酵素液と混合し、30℃、30分反応の後、1部をシリカゲルプレート(メルク社製)にスポットし、n-ブタノール、エタノール、水それぞれ2:1:1の体積比からなる展開液で展開した。バイオイメージアナライザー(富士写真フィルム社製)で5'-イノシン酸のスポットを検出し定量した。また、粗酵素液の蛋白質濃度はウシ血清アルブミンを標準としてバイオ・ラッド社製プロテインアッセイキットを用いて測定し、酵素の比活性を算出した。対照として、プラスミドpHK4による形質転換体ATCC21477/pHK4の比活性を求めた。その結果を表1に示した。ATCC21477/pHK4では活性が検出されなかったのに対し、ATCC21477/pIGK-3は高い活性を有していた。この結果から、導入したエシェリヒ・コリ由来の断片がコリネバクテリウム・アンモニアゲネスにおいてイノシンーグアノシンキナーゼ活性を発現していることが示された。

なお、プラスミドpHK4は、pIGK-3からtrpプロモーター及びイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子を除去した構造を有しており、対照として使用した。

エシェリヒア・コリHB101にpHK4を保持させた株は、AJ13136と命名され、1995年8月1日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号(郵便番号305)工業技術院生命工学工業技術研究所にブタベスト条約に基づき国際寄託され、受託番号FERM BP-5186が付与されている。

表 1

菌 株	比活性(nmol/min/mg protein)
ATCC21477/pHK4	検出されず
ATCC21477/pIGK-3	186.6

実施例2 (エシェリヒア・コリ由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子保持株を用いたイノシンからの5'-イノシン酸の生産)

ポリペプトン1%、酵母エキス1%、グルコース5%、リン酸二水素カリウム0.4%、硫酸マグネシウム0.1%、硫酸アンモニウム0.5%、尿素0.5%、硫酸第一鉄0.001%、硫酸マンガン0.001%、チアミン塩酸塩0.005g/l、パントテン酸カルシウム0.01g/l、ビオチン30 μ g/l、アデニン0.05%、及びカナマイシン50mg/lから成る培地(pH7.2)450mlにコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21477/pIGK-3を接種し、32℃で24時間培養し培養物を得た。この培養物を7,000rpmで10分間遠心分離処理し沈澱物として湿菌体20gを得た。

得られた菌体をイノシン50g/l、リン酸二水素カリウム20g/l、グルコース30g/l、硫酸マグネシウム5g/l、フィチン酸(重量比50%)10g/l、ナイミーンS-2154g/l、アデニン1g/lからなる反応液(pH7.2)20mlに200g/lとなるように懸濁し、攪拌しつつ32℃に保ち反応を行った。pHは4N水酸化ナトリウムを用いて適宜7.2となるように調整し、リン酸二水素カリウムの減少分を適宜添加した。対照としてATCC21477/pHK4について反応を行い30時間反応後の反応液中の5'-イノシン酸を高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。結果を表2に示す。5'-イノシン酸蓄積値は5'-イノシン酸二ナトリウム7.5水和物換算値にて示した。この結果からエシェリヒア・コリ由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子を保持しているATCC21477/pIGK-3でイノシンから5'-イノシン酸への変換がみられた。

表 2

菌 株	5'-イノシン酸蓄積値(g/l)
ATCC21477/pHK4	検出されず
ATCC21477/pIGK-3	72.9

実施例3 (エシェリヒア・コリ由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子保持株を用いたイノシンからの5'-イノシン酸の生産)

実施例2で得た菌体をイノシン60g/l、リン酸二水素カリウム20g/l、グルコース30g/l、硫酸マグネシウム5g/l、フィチン酸(重量比50%)10g/l、ナイミーンS-215 4g/l、アデニン1g/lからなる反応液(pH7.2)50mlに200g/lとなるように懸濁し、通気攪拌しつつ32℃に保ち反応を行った。pHはpH計で測定しつつ常に7.2となるように4N水酸化ナトリウムを添加して調整し、リン酸二水素カリウムの減少分を適宜添加した。22時間反応後の蓄積値は113.8g/lであり添加したイノシンに対するモル収率は約100%であった。

実施例4 (エシェリヒア・コリ由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子保持株を用いたグアノシンからの5'-グアニル酸の生産)

反応液中のイノシンの代わりにグアノシン1g/lを用いて、実施例2と同様にして反応を行った。30時間反応後、反応液中の5'-グアニル酸を高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した結果、ATCC21477/pIGK-3を用いた反応液中には、5'-グアニル酸二ナトリウム塩・6.5水和物換算で0.05g/lの5'-グアニル酸が蓄積していた。

実施例5 (エキシグオバクテリウム・アセチリカムからのイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質の単離精製およびその諸性質)

(1) 菌体および粗酵素抽出液の調製

ポリペプトン1%、バクト・イーストエキストラクト1%、グルコース0.5%及び塩化ナトリウム0.5%から成る培地(pH7.2)100mlに、エキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953を接種し、30℃で24時間培養し培養物を得た。これを2lの同培地に接種し、30℃で8時間培養し、得られた培養物を7,000rpmで10分間遠心分離処理し、沈澱物を2度0.9%塩化ナトリウムで洗浄し湿菌体10gを得た。この菌体を100mM 塩化カルシウム、及び、1mM ジチオスレイトールを含む100mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5)(緩衝液A)10mlに懸濁し、径0.1mmのガラスビーズを加えビーズビーター(バイオスペック社製)にて破碎した。該破碎液を15,000rpmで10分遠心分離処理し上清を同緩衝液にて透析し粗酵素抽出液約20mlを得た。

粗酵素抽出液のイノシンーグアノシンキナーゼ活性を以下の方法により測定した。粗酵素抽出液5 μ lを5mM 塩化マグネシウム、5mM ATP、100mM塩化カリウム及び0.2mM [8-¹⁴C]-イノシンを含む100mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)からなる反応液に加え50 μ lとし、30℃、30分反応した。反応液のうち2 μ lをシリカゲルプレート(メルク社製)にスポットすることにより反応を停止し、n-ブタノール、エタノール、水それぞれ2:1:1の体積比からなる展開液で展開し、バイオイメージアナライザー(FUJIX社製)で5'-イノシン酸のスポットを検出し定量した。また、粗酵素液の蛋白質濃度はウシ血清アルブミンを標準としてプロテインアッセイ(バイオ・ラッド社製)を用いて測定し、酵素の比活性を算出した。粗酵素抽出液には0.45 nmol/min/mg蛋白質のイノシン・グアノシンキナーゼ活性が認められた。

(2) イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質の精製

前項で得られた粗酵素抽出液を緩衝液Aで平衡化したDEAE-トヨパール

(東洋曹達社製) カラムに供し、緩衝液 A で洗浄した後、塩化カリウムを 200 mM を含む同緩衝液でイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質を溶出した。得られた活性画分 25 ml に硫安を 30% 飽和となるように加え 4℃ で 30 分攪はんの後、遠心分離により沈澱物を除去した。得られた上清を 30% 硫安を含む緩衝液 A で平衡化したブチルトヨパール (東洋曹達社製) カラムに供した。同緩衝液で洗浄した後、200 ml の 30% から 15% 硫安を含む緩衝液 A の直線的濃度勾配によりイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質を溶出した。得られた活性画分約 15 ml を 2 l の 50 mM 塩化カリウム、1 mM ジチオスレイトール及び 20% グリセロールを含む 25 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) (緩衝液 B) に対して透析した。

該液を 15,000 rpm で 10 分遠心分離した上清を塩化カリウムを 100 mM とした緩衝液 B で平衡化した MonoQ FPLC HR5/5 (ファルマシア社製) カラムに供した。同緩衝液で洗浄した後、100 mM から 500 mM 硫安の直線的濃度勾配によりイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質を溶出した。得られた活性画分約 5 ml を 2 l の 1 mM ジチオスレイトール及び 20% グリセロールを含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) (緩衝液 C) に対して透析し、同緩衝液にて平衡化したヒドロキシルアパタイト TSK-GEL HA-1000 (東洋曹達社製) カラムに供した。同緩衝液で洗浄した後、30 ml の 10 mM から 500 mM のリン酸カリウムを含む緩衝液 C の直線的濃度勾配にてイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質を溶出した。

得られた活性画分約 6 ml を再度同様の操作を繰り返しヒドロキシルアパタイトカラムに供し、30 ml の 10 mM から 200 mM のリン酸カリウムを含む緩衝液 C の直線的濃度勾配にてイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質を溶出した。得られた活性画分のうち高活性画分 2 ml を 1 mM ジチオスレイトール、20% グリセロール及び 100 mM 塩化カリウムを含む 25 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したゲル濾過 HiLoad Superdex 200 pg 16/60 (ファルマシア社製) カラムに供し、同緩衝液にて溶出した。高活性画分 2 ml のうち 5 μ l を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、

銀染色（ナカライテスク社製）にて分子量約36キロダルトンの蛋白が検出された。これによりエキシグオバクテリウム・アセチリカム由来のイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質が単離されその分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上36キロダルトンであることが明かとなった。

（3）エキシグオバクテリウム・アセチリカム由来のイノシンーグアノシンキナーゼの諸性質

精製されたイノシンーグアノシンキナーゼを5 mM 塩化マグネシウム、5 mM ATP、100 mM 塩化カリウム、0.16 mM グアノシン及び0.04 mM [8-¹⁴C]-グアノシンを含む100 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 7.5）に加えた反応液50 μ lを基本組成として30℃、10分反応した。該酵素は次の諸性質を有していた。

1. 作用

ATP、2'-デオキシアデノシン三リン酸、グアノシン三リン酸、2'-デオキシグアノシン三リン酸及びチミジン三リン酸からなる群より選ばれるヌクレオシド三リン酸をリン酸供与体として、グアノシン、イノシン及び2'-デオキシグアノシンからなる群より選ばれるヌクレオシドにリン酸基を転移し、それぞれ5'-グアニル酸、5'-イノシン酸及び2'-デオキシ-5'-グアニル酸からなる群より選ばれるヌクレオシドの5'-モノリン酸エステルを生成する。

2. 基質特異性

グアノシンに変えて各種ヌクレオシドを0.5 mM加え、ATPに[γ -³²P]-ATPを添加することにより反応を行った。生成したヌクレオシド5'-リン酸エステルを測定した結果を表3に示した。グアノシン、イノシン及び2'-デオキシグアノシンがリン酸受容体となった。

表 3

ヌクレオシド (0.5 mM)	相対活性 (%)
グアノシン	100
2'-デオキシグアノシン	4
イノシン	5
キサントシン	0
アデノシン	0
2'-デオキシアデノシン	0

A T P に代えて各種ヌクレオシド三リン酸を 5 mM 用いて反応を行い、リン酸供与体を検討した結果を表 4 に示した。

A T P の他に、2'-デオキシアデノシン三リン酸、グアノシン三リン酸、2'-デオキシグアノシン三リン酸及びチミジン三リン酸がリン酸供与体となった。

表 4

ヌクレオシド三リン酸 (5 mM)	相対活性 (%)
A T P	1 0 0
2' - デオキシアデノシン三リン酸	7 1
グアノシン三リン酸	5 9
2' - デオキシグアノシン三リン酸	6 1
シチジン三リン酸	6
ウリジン三リン酸	4
チミジン三リン酸	3 5
無添加	0

3. 至適 pH

緩衝液成分を 100 mM の酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH 4.2-5.6)、2-モルホリノエタンスルホン酸 (以下 MES) - 水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 5.4-6.3)、3-モルホリノプロパンスルホン酸 (以下 MOPS) - 水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 6.3-7.2)、トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2-8.8)、シクロヘキシルアミノプロパンスルホン酸 (以下 CAPS) - 水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.8-10.4) あるいはグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 10.3-11.0) に変更し、反応を行った。至適 pH は 7.7-9.9 であった。

4. pH 安定性

酵素を 2.5 mg/ml ウシ血清アルブミン、25 mM 塩化カリウム、0.25 mM ジチオスレート及び 5% グリセロールを含む 250 mM 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH 1.5-5.6)、MES-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH

H 5. 4 - 6. 4)、M O P S - 水酸化ナトリウム緩衝液 (p H 6. 3 - 7. 3)、トリス - 塩酸緩衝液 (p H 7. 2 - 8. 8)、C A P S - 水酸化ナトリウム緩衝液 (p H 8. 9 - 10. 4) あるいはグリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液 (p H 10. 5 - 13. 3) にて室温で 30 分処理を行った後活性を測定した。p H 6. 7 - 12. 1 の範囲で活性は安定であった。

5. 至適温度

温度を 16 °C - 60 °C の範囲で反応を行ったところ、至適温度は 30 °C - 50 °C であった。

6. 温度安定性

酵素を 5 m g / m l ウシ血清アルブミン、50 m M 塩化カリウム、0. 5 m M ジチオスレイトール及び 10 % グリセロールを含む 12. 5 m M トリス - 塩酸緩衝液 (p H 7. 5) で 4 - 60 °C、30 分処理し、残存活性を測定した。25 °C 以下の処理で 50 % 以上の活性が残存し、40 °C 以上では失活した。

7. 金属要求性

反応液中の塩化マグネシウムを各種金属イオンに変更し反応を行った。結果を表 5 に示した。本活性には金属イオンが必要であり、マグネシウムイオン以外にマンガンイオン、コバルトイオン及び、鉄イオンによって反応が進行した。

表 5

金属塩 (5 mM)	相対活性 (%)
無添加	1
MgCl ₂ · 6H ₂ O	100
MnCl ₂ · 4H ₂ O	55
ZnCl ₂	1
NiCl ₂ · 6H ₂ O	1
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	36
MgSO ₄ · 7H ₂ O	107
FeSO ₄ · 7H ₂ O	24

8. 金属イオンによる影響

反応組成に各種金属イオンを 1 mM 加えたときの相対活性を表 6 に示した。本酵素は、銅イオン及び、水銀イオンで強く阻害を受け、亜鉛イオン及び、カドミウムイオンでも阻害を受けた。

表 6

金属塩 (1 mM)	相対活性 (%)
無添加	100
MnCl ₂ · 4H ₂ O	81
ZnCl ₂	58
NiCl ₂ · 6H ₂ O	113
CaCl ₂ · 2H ₂ O	71
CoCl ₂ · 6H ₂ O	103
BaCl ₂	106
CuCl ₂ · 2H ₂ O	25
CdCl ₂	43
HgCl ₂	22
MgSO ₄ · 7H ₂ O	110
FeSO ₄ · 7H ₂ O	95

9. K_m値

反応組成の基質濃度を変化させ測定した本酵素のK_m値はグアノシンに対して0.03 mM、イノシンに対して1 mM、グアノシンを基質とした場合、ATPに対しては1.6 mMであった。

10. 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約36キロダルトンである。

実施例6 (エキシグオバクテリウム・アセチリカム染色体からの遺伝子の単離)

(1) N末端アミノ酸配列の決定

実施例5(2)で得られた活性画分約2 mlをセントリコン-10 (アミコン

社製)を用いて6,000rpmで3時間の遠心操作により約0.2mlに濃縮した。これをプロスピン(アプライドバイオシステム社製)を用いて遠心操作により蛋白をフィルター上にプロットした。このフィルターを20%メタノールで3回洗浄の後、乾燥しプロテインシーケンサー476A(アプライドバイオシステムズ社)を用いてN末端のアミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列を配列表配列番号3に示す。Xaaは同定できなかったものを示す。未同定アミノ酸1個を含むN末端の28アミノ酸が決定された。

(2) エキシグオバクテリウム・アセチリカムの染色体DNAの調製とN末端領域の増幅

実施例5(1)と同様に500mlの培養液からエキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953の湿菌体3gを得た。該菌体から斉藤、三浦の方法(Biochem. Biophys. Acta., 72, 619, (1963))により染色体DNAを抽出した。

前項(1)で得られたN末端アミノ酸配列を基にオリゴヌクレオチドを合成した。塩基配列は、コドンの縮退を考慮し、配列表配列番号4及び5に示すオリゴヌクレオチドの混合物とした。

プライマーとして該オリゴヌクレオチド0.25 μ mol、鋳型としてエキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953の染色体DNA 0.1 μ g及びタック遺伝子ポリメラーゼ(宝酒造社製)2.5ユニットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μ M、50mM 塩化カリウム、1.5mM

塩化マグネシウム及び0.0001%ゼラチンを含有する10mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.3)0.1mlに添加し、94℃を30秒、55℃を30秒、72℃を1分のサイクルを30回繰り返すPCR法を行った。反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、増幅された約80ベースのDNA断片をガラスパウダー(宝酒造社製)を用いて回収した。このDNA断片約0.2 μ gをクレノウフラグメント2ユニット、dATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μ M、1mM 2-メルカプトエタノール及び7mM 塩化マグネシウムを含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)50 μ lに添加し、37℃で30分平滑末端化反応した。該反応液をフェノール抽出及びエタノール沈澱した。沈澱物として得られた平滑末端化されたDNA断片をT4ポリヌクレオチドキナーゼ

10 ユニット、10 mM 塩化マグネシウム、5 mM ジチオスレイトール、0.1 mM スペルミジン、0.1 mM EDTA を含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) に溶解し、末端リン酸化反応を 37℃ で 1 時間行った。該反応液をフェノール抽出及びエタノール沈澱し、沈澱物として PCR 産物の末端平滑化及びリン酸化物を回収した。

プラスミドベクター pUC18 (宝酒造社製) 1 μ g 及び制限酵素 SmaI 20 ユニットの、10 mM 酢酸マグネシウム、66 mM 酢酸カリウム、0.5 mM ジチオスレイトール及び 0.01% 牛血清アルブミンを含有する 33 mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 7.9) 50 μ l に混合し、温度 30℃ で 2 時間反応させて消化液を得、該液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈澱した。この後、プラスミドベクター由来の DNA 断片が再結合するのを防止するため、DNA 断片の脱リン酸化を行い、常法によりフェノール抽出処理し、エタノール沈澱を行なった。

この SmaI で消化された pUC18 を 0.1 μ g、PCR 産物の末端平滑化及びリン酸化物約 0.1 μ g 及び T4 DNA リガーゼ 1 ユニット (宝酒造社製) を 6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール及び 10 mM ATP を含有する 66 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 20 μ l に添加し、温度 16℃ で 8 時間反応し、DNA を連結させた。次いで該 DNA 混合物で、常法によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造社製) を形質転換し、これを 100 μ g/ml のアンピシリンを含む L 寒天培地上にまき、形質転換体を得た。

得られた形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミド DNA を調製した。

該プラスミド DNA はエキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 の染色体 DNA 由来の約 80 ベースの DNA 断片を含んでいた。得られたプラスミド DNA を用いて該 DNA 断片の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (パーキンエルマー社製)

を用いSangerの方法 (J. Mol. Biol., 143, 161 (1980)) に従って行った。これによりエキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 のイノシンーグアノシンキナーゼ蛋白のN末端領域に相当するDNA 83ベースの塩基配列が決定された。

(3) エキシグオバクテリウム・アセチリカムのイノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子断片の単離

前項(2)で調製したエキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 の染色体DNA 10 μ g を EcoRI 40 ユニット、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム及び1 mM ジチオスレイトールを含有する50 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) に混合し、温度37℃で2時間反応させた。反応終了液を常法によりフェノール抽出処理し、エタノール沈澱処理して EcoRI で消化されたエキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 の染色体DNAを得た。この EcoRI で消化されたDNAを1 μ g、EcoRI カセット (宝酒造社製) 0.05 μ g 及びT4 DNAリガーゼ 10 ユニット (宝酒造社製) を6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール及び10 mM ATPを含有する66 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) に添加し、温度16℃で8時間反応し、DNAを連結させた。該反応液をフェノール抽出処理し、エタノール沈澱処理して EcoRI カセットを連結したエキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 の染色体DNA消化物を得た。

前項(2)で決定された配列を基にそれぞれ配列表配列番号6及び7に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドS1及びS2を合成した。

プライマーとしてオリゴヌクレオチドS1及びカセットプライマーC1 (宝酒造社製) をそれぞれ0.2 μ mol、鋳型として EcoRI カセットを連結したエキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 の染色体DNA消化物0.2 μ g 及びタックDNAポリメラーゼ (宝酒造社製) 2.5 ユニットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μ M、50 mM 塩化カリウム、1.5 mM 塩化マグネシウム及び0.0001%ゼラチンを含有する10 mM

M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3) 0.1 ml に添加し、94℃を30秒、55℃を2分、72℃を3分のサイクルを25回繰り返すPCR法を行った。該反応液の1 μ l を鋳型とし、プライマーとして合成したオリゴヌクレオチド S2 及びカセットプライマー C2 (宝酒造社製) それぞれ 0.2 μ mole を用いて同条件でPCR反応を行った。該反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供したところ、約1,000ベースの断片のみが特異的に増幅されており蛋白のN末端領域から遺伝子の下流側の EcoRI 切断部位までを含むDNA断片が取得された。

該DNA断片をガラスパウダー (宝酒造社製) を用いて回収した。このDNA断片約0.2 μ g をクレノウフラグメントを用いて37℃で30分平滑末端化反応した。該反応液をフェノール抽出及びエタノール沈澱した。沈澱物として回収したDNA断片をT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて末端リン酸化反応を37℃で1時間行った。該反応液をフェノール抽出及びエタノール沈澱し、沈澱物としてPCR産物の末端平滑化及びリン酸化物を回収した。

プラスミドベクター pUC18 (宝酒造社製) 1 μ g を制限酵素 SmaI を用いて温度30℃で2時間反応させて消化液を得、該液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈澱した。この後、バクテリアル・アルカリフォスファターゼ処理によりDNA断片の脱リン酸化を行い、フェノール抽出処理し、エタノール沈澱を行なった。

この SmaI で消化された pUC18 を 0.1 μ g、PCR産物の末端平滑化及びリン酸化物約0.1 μ g 及びT4 DNAリガーゼ1ユニット (宝酒造社製) を用いて温度16℃で8時間反応し、DNAを連結させた。次いで該DNA混合物で、エシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造社製) を形質転換し、これを100 μ g/ml のアンピシリンを含むL寒天培地上にまき、形質転換体を得た。

得られた形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミドDNAを調製し、PCRによる増幅断片を含むプラスミドを得た。このプラスミドを pCS2 と命名した。

オリゴヌクレオチド S 1、S 2 に対して相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、それぞれ S 4、S 3 とした。プライマーとしてオリゴヌクレオチド S 3 およびカセットプライマー C 1 (宝酒造社製)、鋳型として E c o R I カセットを連結したエキシングオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 の染色体 DNA 消化物を用いて同条件の PCR 法による増幅を行った。得られた反応液を鋳型とし、プライマーとしてオリゴヌクレオチド S 4 及びカセットプライマー C 2 (宝酒造社製) を用いて PCR 法を行い、約 2,300 ベースの蛋白の N 末端領域から遺伝子の上流側の E c o R I 切断部位までを含む DNA 断片を増幅した。

該 DNA 断片約 0.2 μ g をクレノウフラグメントを用いて 37℃ で 30 分平滑末端化反応した。該反応液をフェノール抽出及びエタノール沈澱した。沈澱物として回収した DNA 断片を制限酵素 K p n I 10 ユニット、10 mM 塩化マグネシウム及び 1 mM ジチオスレイトールを含有する 10 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) 50 μ l に混合し、温度 37℃ で 2 時間反応させて消化液を得、該液をフェノール抽出及びエタノール沈澱した。

プラスミドベクター pUC18 (宝酒造社製) 1 μ g 及び制限酵素 K p n I、H i n c II それぞれ 5 ユニットずつを 10 mM 塩化マグネシウム、50 mM 塩化ナトリウム及び 1 mM ジチオスレイトールを含有する 33 mM トリスー酢酸緩衝液 (pH 7.9) 50 μ l に混合し、温度 37℃ で 2 時間反応させて消化液を得、該液をフェノール抽出処理し、エタノール沈澱を行なった。

この K p n I 及び H i n c II で消化された pUC18 を 0.1 μ g、PCR 産物の末端平滑化及び K p n I 消化物約 0.1 μ g を T4 DNA リガーゼ (宝酒造社製) を用いて温度 16℃ で 8 時間反応し、DNA を連結させた。次いで該 DNA 混合物で、エシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造社製) を形質転換し、これを 100 μ g/ml のアンピシリンを含む L 寒天培地上にまき、形質転換体を得た。

得られた形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミド DNA を調製し、約 600 ベースの蛋白質の N 末端領域から遺伝子の上流側の K p n I 切断部位までを含む DNA 断片を含むプラスミドを選択した。このプラスミドを pKS4 と命

名した。

(4) エキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子の塩基配列の決定

前項(3)で得られたプラスミド pCS2 及び pKS4 の塩基配列の決定を行った。これから推定されるオープン・リーディング・フレームの塩基配列を配列表配列番号1に示す。また、その塩基配列より推定される産物のアミノ酸配列を配列表配列番号2に示した。すなわち、配列表配列番号2に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質をコードする遺伝子が、エキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子である。

塩基配列、アミノ酸配列おのおのについて既知の配列との相同性比較を行った。用いたデータベースはEMBL及びSWISS-PROTである。その結果、配列表配列番号1に示されるDNA及びそれにコードされる蛋白質は新規であることが判明した。また、これまでイノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子として唯一明らかになっているエシェリヒア・コリ由来のイノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子配列とは相同性は低く全く別のイノシンーグアノシンキナーゼをコードする遺伝子であることが明かとなった。

本遺伝子のコードする蛋白質は、303個のアミノ酸から成り、その配列から予想される蛋白の分子量は32.5キロダルトンであった。

実施例7 (エキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子発現プラスミドの構築とコリネバクテリウム・アンモニアゲネスへの導入)

(1) PCR法によるイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子の増幅とクローニング
エキシグオバクテリウム・アセチリカム由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子の両端に位置し、それぞれ制限酵素 PstI、SphI 切断部位を有する配列表配列番号8及び9に示すオリゴヌクレオチドを合成した。

プライマーとして該オリゴヌクレオチド0.25 μ mol、鋳型として実施例6(2)で調製したエキシグオバクテリウム・アセチリカム ATCC 953 の

染色体DNA 0.1 μ g 及びタックDNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) 2.5 ユニットを dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 200 μ M、50 mM 塩化カリウム、1.5 mM 塩化マグネシウム及び 0.0001%ゼラチンを含有する 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3) 0.1 ml に添加し、94℃ を 30 秒、55℃ を 30 秒、72℃ を 30 秒のサイクルを 25 回繰り返す PCR 法を行った。反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、目的とする DNA 断片をガラスパウダー (宝酒造社製) を用いて回収した。該 DNA 断片約 2 μ g 及び制限酵素 PstI および SphI それぞれ 10 ユニットを 10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 1 mM ジチオスレイトールを含有する 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 50 μ l に混合し、温度 37℃ で 2 時間反応させて消化液を得、該液をフェノール抽出及びエタノール沈澱した。

プラスミド pHSG298 (宝酒造社製) 1 μ g 及び制限酵素 PstI および SphI それぞれ 20 ユニットを 10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 1 mM ジチオスレイトールを含有する 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) における混合し、温度 37℃ で 2 時間反応させた。反応終了液を常法によりフェノール抽出処理し、エタノール沈澱処理して PstI および SphI で消化されたプラスミド pHSG298 を得た。この PstI および SphI で消化された pHSG298 を 0.1 μ g、PstI および SphI で消化された PCR による増幅断片 0.5 μ g 及び T4 DNA リガーゼ 1 ユニット (宝酒造社製) を 6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール及び 10 mM ATP を含有する 66 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に添加し、温度 16℃ で 8 時間反応し、DNA を連結させた。次いで該 DNA 混合物で、常法によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造社製) を形質転換し、これを 100 μ g/ml のカナマイシンを含む寒天培地上にまき、形質転換体を得た。

得られた形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミド DNA を調製しアガロースゲル電気泳動を行うことにより、プラスミド pHSG298 にエキシゲオバクテリウム・アセチリカム由来のイノシングアノシンキナーゼ遺伝子が挿入さ

れた組換え体プラスミドを選択した。このプラスミドをpBA-1と命名した。

(2) エシェリヒア・コリのtrpプロモーターの挿入

実施例1(2)と同様にして、BamHI及びPstIで切断されたエシェリヒア・コリtrpプロモーターを含むDNA断片を得た。

前項(1)で得られたイノシングアノシンキナーゼ遺伝子を含むDNA断片が挿入された組換え体プラスミドpBA-1 1 μ gをBamHIおよびPstIで消化し、反応終了液を常法によりフェノール抽出処理し、エタノール沈澱処理してBamHIおよびPstIで消化されたプラスミドを得た。このBamHIおよびPstIで消化されたpBA-1を0.1 μ g及びBamHI及びPstIで切断されたエシェリヒア・コリtrpプロモーターを含むDNA断片をT4 DNAリガーゼ1ユニット(宝酒造社製)を用いて連結反応し、DNAを連結させた。次いで該DNA混合物で、エシェリヒア・コリ JM109(宝酒造社製)を形質転換し、これを100 μ g/mlのカナマイシンを含むL寒天培地上にまき、形質転換体を得た。

得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製しアガロースゲル電気泳動を行うことにより、プラスミドpBA-1にエシェリヒア・コリtrpプロモーターが挿入された組換え体プラスミドを選択し、これをpBA-2と命名した。

なお、プラスミドpBA-2を保持するエシェリヒア・コリAJ13094は、日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号(郵便番号305)工業技術院生命工学工業技術研究所において、平成7年4月27日付でブタベスト条約に基づき寄託され、受託番号FERM BP-5089が付与されている。

(3) コリネバクテリウム由来複製起点の挿入

前項(2)で得られたイノシングアノシンキナーゼ遺伝子にtrpプロモーターを連結したDNA断片を含む組換え体プラスミドpBA-2 1 μ gを前項(2)の反応液組成でBamHIにて消化し、フェノール抽出処理し、エタノール沈澱を行なった。これを実施例6(2)の反応組成にてKpnIで消化し、フ

フェノール抽出処理し、エタノール沈澱を行なった。得られた B a m H I 及び K p n I で消化されたプラスミド p B A - 2 をバクテリアル・アルカリフォスファターゼ処理により DNA 断片の脱リン酸化を行い、フェノール抽出処理、エタノール沈澱を行なった。

一方、特開平 5 - 7 4 9 1 号に記載のプラスミド p H C 4 1 μ g を同様に B a m H I 及び K p n I で消化し、フェノール抽出処理し、エタノール沈澱を行なった。上記で得られた B a m H I 及び K p n I で消化されたプラスミド p B A - 2 0.1 μ g および B a m H I 及び K p n I で消化されたプラスミド p H C 4 由来の DNA 断片 0.2 μ g 及び T 4 DNA リガーゼ（宝酒造社製）を用いて、温度 16℃ で 8 時間連結反応し、DNA を連結させた。次いで該 DNA 混合物で、エシェリヒア・コリ J M 1 0 9 （宝酒造社製）を形質転換し、これを 100 μ g / m l のカナマイシンを含む寒天培地上にまき、形質転換体を得た。

得られた形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミド DNA を調製しアガロースゲル電気泳動を行うことにより、プラスミド p B A - 2 にコリネバクテリウム属細菌由来の複製起点を含む組換え体プラスミドを選択し、これを p B A - 3 と命名した。

(4) p B A - 3 の A T C C 2 1 4 7 7 株への導入

前項で得られた p B A - 3 0.1 μ g を電気パルス法を用いた形質転換の常法（特開平 2 - 2 0 7 7 9 1 号公報）に従い、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス A T C C 2 1 4 7 7 株に導入した。これをポリペプトン 1 %、酵母エキス 1 %、塩化ナトリウム 0.5 %、グルコース 0.5 % 及びカナマイシン 50 μ g / m l から成る寒天培地上にまき、形質転換体 A T C C 2 1 4 7 7 / p B A - 3 を得た。

(5) 組換え体のイノシンーグアノシンキナーゼ活性の測定

前項で得られたコリネバクテリウム・アンモニアゲネス A T C C 2 1 4 7 7 / p B A - 3 をポリペプトン 1 %、酵母エキス 1 %、グルコース 5 %、リン酸 2 水素カリウム 0.4 %、硫酸マグネシウム 0.1 %、硫酸アンモニウム 0.5 %、

尿素 0.5%、硫酸第一鉄 0.001%、硫酸マンガン 0.001%、チアミン塩酸塩 0.005 g/l、パントテン酸カルシウム 0.01 g/l、ビオチン 30 μ g/l、アデニン 0.05%、及びカナマイシン 50 mg/l から成る培地 (pH 7.2) 50 ml に接種し、32℃で24時間培養した。該培養液を常法に従って遠心分離し、菌体を集めた。

この菌体を 0.9%塩化ナトリウム水溶液で懸濁し、遠心分離する操作を2回繰り返し菌体を洗浄した。該菌体を 20%グリセロール、100 mM塩化カリウムを含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、150 W、の出力で20分超音波処理した後、15,000 rpm、30分遠心分離して上清を得た。この細胞破砕液をセファデクス G-25 (ファルマシア社製) カラムクロマトグラフィーに供し、低分子量物質を除いたものを粗酵素液とした。

得られた粗酵素液のイノシン-グアノシンキナーゼ活性を、プラスミド pHK4 で同様に形質転換して得た ATCC 21477 / pHK4 を対照として実施例 5 (1) の方法にて測定した。その結果を表 7 に示した。ATCC 21477 / pHK4 では活性は検出されなかったのに対し、ATCC 21477 / pBA-3 は高い活性を有していた。この結果から、導入したエキシグオバクテリウム由来の遺伝子がコリネバクテリウム・アンモニアゲネスにおいてイノシン-グアノシンキナーゼ活性を発現していることが示された。

なお、プラスミド pHK4 は、pBA-3 から trp プロモーター及びイノシン-グアノシンキナーゼ遺伝子領域を除去した構造を有しており、対照として使用した。

エシェリヒア・コリ HB101 に pHK4 を保持させた株は、AJ13136 と命名され、1995年8月1日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号 (郵便番号 305) 工業技術院生命工学工業技術研究所にブタペスト条約に基づき国際寄託され、受託番号 FERM BP-5186 が付与されている。

表 7

菌株	比活性 (nmol/min/mg protein)
ATCC21477/pHK4	検出されず
ATCC21477/pBA-3	50.4

実施例 8 (エキシグオバクテリウム・アセチリカム由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから 5'-イノシン酸の生産)

ポリペプトン 1%、酵母エキス 1%、グルコース 5%、リン酸二水素カリウム 0.4%、硫酸マグネシウム 0.1%、硫酸アンモニウム 0.5%、尿素 0.5%、硫酸第一鉄 0.001%、硫酸マンガン 0.001%、チアミン塩酸塩 0.005 g/l、パントテン酸カルシウム 0.01 g/l、ビオチン 30 µg/l、アデニン 0.05%、及びカナマイシン 50 mg/l から成る培地 (pH 7.2) 450 ml にコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21477/pBA-3 を接種し、32℃で 24 時間培養し培養物を得た。この培養物を 7,000 rpm で 10 分間遠心分離処理し沈澱物として湿菌体 20 g を得た。

得られた菌体をイノシン 50 g/l、リン酸二水素カリウム 20 g/l、グルコース 30 g/l、硫酸マグネシウム 5 g/l、フィチン酸 (重量比 50%) 10 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、アデニン 1 g/l からなる反応液 (pH 7.2) 20 ml に 200 g/l となるように懸濁し、攪拌しつつ 32℃ に保ち反応を行った。pH は 4 N 水酸化ナトリウムを用いて適宜 7.2 となるように調整し、リン酸二水素カリウムの減少分を適宜添加した。対照として ATCC 21477/pHK4 について同様に反応を行った。30 時間反応後の反応液中の 5'-イノシン酸を高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。

結果を表 8 に示す。5'-イノシン酸蓄積値は 5'-イノシン酸二ナトリウム

7. 5水和物換算値にて示した。この結果からイノシンーグアノシンキナーゼ活性を発現しているATCC21477/pBA-3でイノシンから5'-イノシン酸への変換がみられた。

表 8

菌株	5'-イノシン酸蓄積値(g/l)
ATCC21477/pHK4	検出されず
ATCC21477/pBA-3	69.8

実施例9 (エキシグオバクテリウム・アセチリカム由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子保持株を用いたイノシンから5'-イノシン酸への変換)

実施例8で得た菌体をイノシン60g/l、リン酸二水素カリウム20g/l、グルコース30g/l、硫酸マグネシウム5g/l、フィチン酸(重量比50%)10g/l、ナイミーンS-2154g/l、アデニン1g/lからなる反応液(pH7.2)50mlに200g/lとなるように懸濁し、通気攪拌しつつ32℃に保ち反応を行った。pHはpH計で測定しつつ常に7.2となるように4N水酸化ナトリウムを添加して調整し、リン酸二水素カリウムの減少分を適宜添加した。30時間反応後の蓄積値は111.3g/lであり添加したイノシンに対するモル収率は約100%であった。

実施例10 (イノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子保持株を用いたグアノシンから5'-グアニル酸への変換)

実施例8で得た菌体をグアノシン25g/l、リン酸二水素カリウム20g/l、グルコース30g/l、硫酸マグネシウム5g/l、フィチン酸(重量比50%)10g/l、ナイミーンS-2154g/l、アデニン1g/lからなる

る反応液 (pH 7.2) 50 ml に 200 g/l となるように懸濁し、通気攪拌しつつ 32℃ に保ち反応を行った。pH は pH 計で測定しつつ常に 7.2 となるように 4 N 水酸化ナトリウムを添加して調整した。8 h 反応後の 5'-グアニル酸の蓄積値は 7.3 g/l であり添加したグアノシンに対するモル収率は約 14% であった。

実施例 11 (エキシグオバクテリウムバクテリウム・アウランティアカム、クルチア・ギブソーニ、クルチア・ゾプフィにおけるイノシン-グアノシンキナーゼ活性の検出)

ポリペプトン 1%、バクト・イーストエキストラクト 1%、グルコース 0.5% 及び塩化ナトリウム 0.5% 及び炭酸ナトリウム 1% から成る培地 (pH 9.7) 50 ml に、エキシグオバクテリウムバクテリウム・アウランティアカム ATCC 35652 を接種し、また、ポリペプトン 1%、バクト・イーストエキストラクト 1%、グルコース 0.5% 及び塩化ナトリウム 0.5% からなる培地 (pH 7.2) 50 ml に、クルチア・ギブソーニ ATCC 43195、クルチア・ゾプフィ ATCC 33403 をそれぞれ接種し、30℃ で 4 時間培養し培養物を得た。この培養物を 7,000 rpm で 10 分間遠心分離処理し、沈殿物を 0.9% 塩化ナトリウムで 2 度洗浄し湿菌体を得た。この菌体を緩衝液 A 3 ml に懸濁し、超音波処理にて破碎した。該破碎液を 15,000 rpm で 30 分間遠心分離処理し上清をセファデクス G-25 カラム (ファルマシア社製) を用いて脱塩し、粗酵素抽出液約 3.5 ml を得た。粗酵素抽出液 5 μ l を 5 mM 塩化マグネシウム、5 mM ATP、100 mM 塩化カリウム、0.06 mM グアノシン及び 0.04 mM [8-¹⁴C]-グアノシンを含む 100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 50 μ l 中に加えた反応液を 30℃、10 分反応した。生成した 5'-グアニル酸を定量し、イノシン-グアノシンキナーゼ比活性を測定した。その結果を表 9 に示した。いずれの株においてもイノシン-グアノシンキナーゼ活性が検出された。

表 9

菌株	比活性(nmol/min/mg protein)
エキシグオバクテリウム・アウランティアカム	46.3
クルチア・ギブソーニ	6.64
クルチア・ゾプフィ	1.19

実施例 12 (エキシグオバクテリウム・アウランティアカム、クルチア・ギブソーニ、クルチア・ゾプフィ染色体におけるエキシグオバクテリウム・アセチリカム由来イノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子と相同性を有する断片の検出)

実施例 11と同様にエキシグオバクテリウム・アウランティアカム ATCC 35652、クルチア・ギブソーニ ATCC 43195及びクルチア・ゾプフィ ATCC 33403を30℃で16時間培養し、培養液から実施例 5(2)と同様にそれぞれの染色体DNAを調製した。該染色体DNA 10μg及び制限酵素EcoRI 100ユニットを10mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウム及び1mMジチオスレイトールを含有する50mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.5)におのおの混合し、温度37℃で14時間反応させた後、常法によりフェノール抽出及びエタノール沈澱した。得られたEcoRIによって切断された染色体DNAを0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, p9.31 (1989))に記載の方法でアガロースゲルからナイロンフィルター(デュポン社製)にアルカリ転写を行った。該フィルターをエキシグオバクテリウム・アセチリカム由来イノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子を含む断片をプローブとして、42℃で14時間、2.0%ホルムアミド存在下でハイブリダイゼーションを行った。該フィルターを0.2×SSC(0.03M塩化ナトリウム、3mMクエン酸ナトリウム)、0.1%SDSで洗浄したところ、いずれの菌株においても相同断片が検出された。中でもエキシグオバクテリウム・アウランティアカムの染色体において最も強い相同性を示す約4.6kbの断片が検出された。

実施例 13 (エキシグオバクテリウム・アウランティアカム ATCC 35652 染色体からのエキシグオバクテリウム・アセチリカム由来イノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子と相同な断片の単離)

エキシグオバクテリウム・アウランティアカム ATCC 35652 の染色体 DNA 18 μ g と制限酵素 EcoRI 200 ユニットを 37℃ で 3 時間反応し、フェノール抽出処理し、エタノール沈澱処理した。該消化断片をアガロースゲル電気泳動に供し、4.6 kb 付近の断片をガラスパウダー (宝酒造社製) を用いて回収し、エキシグオバクテリウム・アウランティアカム ATCC 35652 株染色体断片を得た。

プラスミドベクター pMW218 (日本ジーン社製) 1 μ g を制限酵素 EcoRI 20 ユニットを用いて温度 37℃ で 3 時間反応させて消化液をフェノール抽出及びエタノール沈澱した。この後、アルカリフォスファターゼ処理により DNA 断片の脱リン酸化を行い、フェノール抽出処理し、エタノール沈澱を行なった。

この EcoRI で消化された pMW218 を 0.2 μ g、EcoRI で消化されたエキシグオバクテリウム・アウランティアカム染色体断片 5 μ g を T4 DNA リガーゼ (宝酒造社製) を用いて連結した。次いで該 DNA 混合物で、常法によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造社製) を形質転換し、これを 100 μ g/ml のカナマイシンを含む L 寒天培地上にまき、約 1000 個の形質転換体を得た。

得られた形質転換体から、コロニーハイブリダイゼーション法により、プローブ DNA とハイブリダイズする形質転換体を選択した。該形質転換体からアルカリ溶菌法によりプラスミド DNA を調製した。該プラスミド DNA はエキシグオバクテリウム・アウランティアカム染色体由来の約 4.6 kb の DNA 断片を含んでいた。

実施例 14 (エキシグオバクテリウム・アウランティアカム ATCC 35652 由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子の塩基配列の決定)

実施例 13 で得たプラスミドを各種制限酵素で切断の後、サザンハイブリダイ

ゼーションを行いプローブDNAとハイブリダイズする断片を同定した。その結果、E c o R I 及び P s t I に切断された約2.7キロベースの切断断片がハイブリダイズすることが判明した。該DNA断片をE c o R I 及び P s t I で切断したプラスミドベクターpSTV28（宝酒造社製）に連結し、エシェリヒア・コリJM109に形質転換した。得られた形質転換体の中からMolecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, p.1.90 (1989)) 記載のコロニーハイブリダイゼーション法によりプローブDNAとハイブリダイズする断片をクローン化した。該DNA断片を含むプラスミドを保持するエシェリヒア・コリ菌体の粗酵素抽出液のイノシンキナーゼ活性を実施例7(5)記載の活性測定法により測定したところ対照としたベクター保持株と比較して約300倍の活性を示し、クローン化した断片がエキシグオバクテリウム・アウランティアカム由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子を含んでいることが確認された。

得られたプラスミドDNAを用いてE c o R I 及び P s t I 切断断片の塩基配列の決定を行った。決定された塩基配列から推定されるオープン・リーディング・フレームの塩基配列を配列表配列番号14に示した。また、その塩基配列より推定される産物のアミノ酸配列を配列表配列番号15に示した。塩基配列、アミノ酸配列いずれもエキシグオバクテリウム・アセチリカム由来のイノシンーグアノシンキナーゼと高い相同性を示したが、明らかに新規な遺伝子であった。すなわち、配列表配列番号15に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質をコードする遺伝子が、エキシグオバクテリウム・アウランティアカム ATCC 35652 のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子である。

以上のように、エキシグオバクテリウム・アセチリカム由来のイノシンーグアノシンキナーゼ遺伝子とハイブリダイズすることができる遺伝子が取得され、該遺伝子がイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードすることが確認された。

配 列 表

(1) 一般情報

- (i) 出願人 : 味の素株式会社
- (ii) 発明の名称 : 核酸類の製造方法
- (iii) 配列数 : 15
- (iv) 連絡先 :
- (A) 宛名 : 味の素株式会社
 - (B) 番地 : 京橋 1丁目15番1号
 - (C) 市 : 中央区
 - (D) 州 : 東京都
 - (E) 国 : 日本国
 - (F) ZIP : 104
- (v) コンピューター読取り可能形式
- (A) 媒体 :
 - (B) コンピューター :
 - (C) 操作システム :
 - (D) ソフトウェア :
- (vi) 現行出願データ
- (A) 出願番号 : JP
 - (B) 出願日 : 1996年3月 日
 - (C) 分類 :

(vii) 優先権主張出願データ

- (A) 出願番号 : 特願平 7 - 1 0 2 8 8 8 号
(B) 出願日 : 1 9 9 5 年 3 月 2 4 日
(C) 出願番号 : 特願平 7 - 1 7 7 9 0 0 号
(D) 出願日 : 1 9 9 5 年 6 月 9 日

(viii) 代理人/事務所情報

- (A) 名前 : 佐伯 憲生
(B) 登録番号 : 1 0 2 2 6

(ix) 通信情報

- (A) 電話番号 : 0 3 - 5 6 8 8 - 5 1 3 6
(B) ファクシミリ番号 : 0 3 - 5 6 8 8 - 5 1 3 7

(2) 配列番号 1 の配列の情報

(i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 9 0 9 base pairs
(B) 配列の型 : 核酸
(C) 鎖の数 : 二本鎖
(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : Genomic DNA

(iii) ハイボセティカル : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 起源 :

- (A) 生物名 : エキシグオバクテリウム・アセチリカム
(B) 株名 : A T C C 9 5 3

(ix) 配列の特徴：

- (A) 特徴を表す記号 : CDS
(B) 存在位置 : 1..909
(C) 特徴を決定した方法 : E

(xi) 配列 : SEQ ID NO: 1 :

```
ATGAATAAAA TCGCGGTAAT CGGAAAAGTA TTCGTCGACA TAAAAGGAAC TTCGTTGCT 60
CCTTTGCATA AGGATGCGAA AAACGTAGGA GACATCACGT TTTCAAATGG AGGAACAGGA 120
CGCAACGTAG CACAAAATCT AGCCGTCCTC GGAATGAAG TTCGCTTTAT CTCGACGGTT 180
ACGAATGATC AGATTGGCGT GGGAGTGCTC GATGAGCTGA AATCCTACGG TGCGAATGTG 240
GATCACGTCG AAATGTTAGA AGATCATGGA ATGGGTATGT GGCTAGCTGT CATGGATAAC 300
GAGGGTGACT TGCAAACATC GATCTCGAAA CAACCGGATG CCAAGTTGCT CGAAGAGGCG 360
ATTTTACGTC AATCGATCTA TGCACTCGAT GGAGTCGATG CCGTTGCAAT CGATTTGGAT 420
TTGTCCGTCA CGGTCTTAGA ACGTTTGATT CATTTATGTC GTAAGATGGA GTTGCCATTG 480
TTTGGTGTTT GTGGTCACTT GAGCGTCATC GAACGAAATC GTCATCTGCT ACAAGGGTTC 540
ACTGGATTCA TTTGTAGCCG AGAAGAGGCT GAAATTCTGT CTGATCTATC GATCGTGACG 600
GTCGAAGATG CGATTCATGT AGCAAATGAG CTAGCGAAAA AGGGCGCTCC GTTTACGGTC 660
GTGACGATGA GTGAACTGGG GGC GGCTCTAC GTTGATCGTC GTACGGCGAC ATCAGGTCAC 720
GTCGGAACGA AAAAAGTGAA GGTTGTGCGAC TCAACGGGAG CAGGCGATTG CTTCTTCTCC 780
GCAGTCTTGT CCGAATTGAC ACAGGAAAAG TCAGCAGAAG AGGCTTTGAA GCTTGGTATG 840
AAGGTCGCAG CAGAAGTCAT CGCTTCAACA GAGAATGGAC TCGTTCCTGA AATGCTAGAT 900
GCTCTTCAA 909
```

(2) 配列番号2の配列の情報

(i) 配列の性質：

- (A) 配列の長さ : 303 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 蛋白質

(xi) 配列 : SEQ ID NO: 2 :

```

Met Asn Lys Ile Ala Val Ile Gly Lys Val Phe Val Asp Ile Lys Gly
      5                      10                      15
Thr Ser Phe Ala Pro Leu His Lys Asp Ala Lys Asn Val Gly Asp Ile
      20                      25                      30
Thr Phe Ser Asn Gly Gly Thr Gly Arg Asn Val Ala Gln Asn Leu Ala
      35                      40                      45
Val Leu Gly Asn Glu Val Arg Phe Ile Ser Thr Val Thr Asn Asp Gln
      50                      55                      60
Ile Gly Val Gly Val Leu Asp Glu Leu Lys Ser Tyr Gly Ala Asn Val
      65                      70                      75                      80
Asp His Val Glu Met Leu Glu Asp His Gly Met Gly Met Trp Leu Ala
      85                      90                      95
Val Met Asp Asn Glu Gly Asp Leu Gln Thr Ser Ile Ser Lys Gln Pro
      100                     105                     110
Asp Ala Lys Leu Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Gln Ser Ile Tyr Ala
      115                     120                     125
Leu Asp Gly Val Asp Ala Val Ala Ile Asp Leu Asp Leu Ser Val Thr
      130                     135                     140
Val Leu Glu Arg Leu Ile His Leu Cys Arg Lys Met Glu Leu Pro Leu
      145                     150                     155                     160
Phe Gly Val Cys Gly His Leu Ser Val Ile Glu Arg Asn Arg His Leu
      165                     170                     175

```

Leu Gln Gly Phe Thr Gly Phe Ile Cys Ser Arg Glu Glu Ala Glu Ile
 180 185 190
 Leu Ser Asp Leu Ser Ile Val Thr Val Glu Asp Ala Ile His Val Ala
 195 200 205
 Asn Glu Leu Ala Lys Lys Gly Ala Pro Phe Thr Val Val Thr Met Ser
 210 215 220
 Glu Leu Gly Ala Val Tyr Val Asp Arg Arg Thr Ala Thr Ser Gly His
 225 230 235 240
 Val Gly Thr Lys Lys Val Lys Val Val Asp Ser Thr Gly Ala Gly Asp
 245 250 255
 Ser Phe Phe Ser Ala Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Glu Lys Ser Ala
 260 265 270
 Glu Glu Ala Leu Lys Leu Gly Met Lys Val Ala Ala Glu Val Ile Ala
 275 280 285
 Ser Thr Glu Asn Gly Leu Val Pro Glu Met Leu Asp Ala Leu Gln
 290 295 300

(2) 配列番号3の配列の情報

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 28 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 3:

Met Asn Lys Ile Ala Val Ile Gly Lys Val Phe Val Asp Ile Lys Gly
 1 5 10 15

Thr Xaa Phe Ala Pro Leu His Lys Asp Ala Lys Asn

20

25

(2) 配列番号4の配列の情報

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 17

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO: 4:

ATGAAYAARA THGCNGT 17

(2) 配列番号5の配列の情報

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 17

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

- (iv) アンチセンス : NO
(xi) 配列 : SEQ ID NO: 5 :

TTYTTNGCRT CYTTRTG 17

(2) 配列番号 6 の配列の情報

- (i) 配列の性質 :
(A) 配列の長さ : 23
(B) 配列の型 : 核酸
(C) 鎖の数 : 一本鎖
(D) トポロジー : 直鎖状
(ii) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA
(iii) ハイボセティカル : NO
(iv) アンチセンス : NO
(xi) 配列 : SEQ ID NO: 6 :

TAATCGGAAA AGTATTCGTC GAC 23

(2) 配列番号 7 の配列の情報

- (i) 配列の性質 :
(A) 配列の長さ : 21
(B) 配列の型 : 核酸
(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

(iii) ハイボセティカル : NO

(iv) アンチセンス : NO

(xi) 配列 : SEQ ID NO: 7 :

GGAACCTTCGT TCGCTCCTTT G 21

(2) 配列番号 8 の配列の情報

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 30

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

(iii) ハイボセティカル : NO

(iv) アンチセンス : NO

(xi) 配列 : SEQ ID NO: 8 :

GGCTGCAGGA ATGAATAAAA TCGCGGTAAT 30

(2) 配列番号 9 の配列の情報

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 30
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO: 9:

GGGCATGCTG GAAAGACATA ATACGTTTCG 30

(2) 配列番号 10 の配列の情報

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 1302 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起源:

(A) 生物名: エシェリヒア・コリ

(B) 株名: HM 70

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号 : CDS

(B) 存在位置 : 1..1302

(C) 特徴を決定した方法 : E

(xi) 配列 : SEQ ID NO: 1 O :

ATGAAATTTT	CCGGTAAACG	TAAATCCAAA	CATTACTTCC	CCGTAAACGC	ACGCGATCCG	60
CTGCTTCAGC	AATTCCAGCC	AGAAAACGAA	ACCAGCGCTG	CCTGGGTAGT	GGGTATCGAT	120
CAAACGCTGG	TCGATATTGA	AGCGAAAAGTG	GATGATGAAT	TTATTGAGCG	TTATGGATTA	180
AGCGCCGGGC	ATTCAGTGGT	GATTGAGGAT	GATGTAGCCG	AAGCGCTTTA	TCAGGAACTA	240
AAACAGAAAA	ACCTGATTAC	CCATCAGTTT	GCGGGTGGCA	CCATTGGTAA	CACCATGCAC	300
AACTACTCGG	TGCTCGCGGA	CGACCGTTCG	GTGCTGCTGG	GCGTCATGTG	CAGCAATATT	360
GAAATTGGCA	GTTATGCCTA	TCGTTACCTG	TGTAACACTT	CCAGCCGTAC	CGATCTTAAC	420
TATCTACAAG	GCGTGGATGG	CCCGATTGGT	CGTTGCTTTA	CGCTGATTGG	CGAGTCCGGG	480
GAACGTACCT	TTGCTATCAG	TCCAGGCCAC	ATGAACCAGC	TGCGGGCTGA	AAGCATTCCG	540
GAAGATGTGA	TTGCCGGAGC	CTCGGCACTG	GTTCTCACCT	CATATCTGGT	GCGTTGCAAG	600
CCGGGTGAAC	CCATGCCGGA	AGCAACCATG	AAAGCCATTG	AGTACGCGAA	GAAATATAAC	660
GTACCGGTGG	TGCTGACGCT	GGGCACCAAG	TTTGTCAATTG	CCGAGAATCC	GCAGTGGTGG	720
CAGCAATTCC	TCAAAGATCA	CGTCTCTATC	CTTGCGATGA	ACGAAGATGA	AGCCGAAGCG	780
TTGACCGGAG	AAAGCGATCC	GTTGTTGGCA	TCTGACAAGG	CGCTGGACTG	GGTAGATCTG	840
GTGCTGTGCA	CCGCCGGGCC	AATCGGCTTG	TATATGGCGG	GCTTTACCGA	AGACGAAGCG	900
AAACGTAAAA	CCCAGCATCC	GCTGCTGCCG	GGCGCTATAG	CGGAATTCAA	CCAGTATGAG	960
TTTAGCCGCG	CCATGCGCCA	CAAGGATTGC	CAGAATCCGC	TGCGTGTATA	TTCGCACATT	1020
GCGCCGTACA	TGGGCGGGCC	GGAAAAAATC	ATGAACACTA	ATGGAGCGGG	GGATGGCGCA	1080
TTGGCAGCGT	TGCTGCATGA	CATTACCGCC	AACAGCTACC	ATCGTAGCAA	CGTACCAAAC	1140
TCCAGCAAAC	ATAAATTAC	CTGGTTAACT	TATTCATCGT	TAGCGCAGGT	GTGTAAATAT	1200
GCTAACCGTG	TGAGCTATCA	GGTACTGAAC	CAGCATTAC	CTCGTTTAAC	GCGCGGCTTG	1260
CCGGAGCGTG	AAGACAGCCT	GGAAGAGTCT	TACTGGGATC	GT		1302

(2) 配列番号 1 1 の配列の情報

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 30
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO: 1 1:

GGCTGCAGCC ATGAAATTTT CCGGTAAACG 30

(2) 配列番号 1 2 の配列の情報

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 30
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO: 1 2:

GGAAGCTTAA CGATCCCAGT AAGACTCTTC 30

(2) 配列番号 13 の配列の情報

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 72

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO: 13:

GGGGATCCTG TTGACAATTA ATCATCGAAC TAGTTAACAG TACGCAAGTT CACGTAAAAA 60
GGGTCTGCAG CC 72

(2) 配列番号 14 の配列の情報

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 924 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起源:

(A) 生物名: エキシグオバクテリウム・アウランティアカム

(B) 株名 : A T C C 3 5 6 5 2

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号 : CDS

(B) 存在位置 : 1..924

(C) 特徴を決定した方法: E

(xi) 配列: SEQ ID NO: 1 4:

```

ATGAATACGA TTGCAGTAAT CGGCAAAGTG TTTGTGACACA TAAAAGGAAC GTCGTTCGCC 60
CCCATCCATA AAGATGCGAA AAACGTCGGA GATATCGCCT TCTCAAACGG TGGCACC GGA 120
CGAAACGTCG CTCAGAACTT AGGTGTCTCT GGTAACGATG TTCGGTTTCGT CTCGACCGTG 180
ACGAACGATC AAATCGGAAT CGGTGTCTCT GAAGAACTAC GCAGTTTGAA CGTCAATGTC 240
GAACACGTCG ACTTGCTCGA AGACAACGGC ATGGGTATGT GGCTCGCGGT CATGGACAAT 300
AACGGTGACC TCCAGACGTC AATCTCAAAA CAACCTGACG AGGCGATGAT GGAACAATGC 360
ATCCTCCGTC GCATCGATAC CGTTTTTCGCC GAGAGCACGG CTGTGCGCCAT CGACCTCGAC 420
TTATCGGTCA ACGTCTTAAA CGAGACGATT GAATTGTGCC GTGAGATGAA ACTCCCGCTA 480
TACGGTGTAT GTGGTCACCT CTCGGTCATC GAACGCAACC GTCACCTGCT CCAAGGGTTC 540
ACGGGCTTCA TCTGTAGCCG CGAAGAAGCC GAGATTCTCT CGGATATGTC CATCGTCACG 600
GTTGACGATG CCCTTCGCGT CGCCGAGGTG CTCGCCATGA AAGGAGCGCC GCTCACGATT 660
GTCACGATGA GCGAGCTCGG AGCCGTCTAC GTCGACCTTC GCACGAACGA ACAAGGTCAC 720
GTGCCGACGA CGAAAGTGAA AGTTGCCGAC TCCACAGGCG CCGGGGATTC CTTCTTCTCT 780
GCCGTTATTT CCGAGCTCAT GAAAGAGCAT TCGATTGAAG ATGCACTTCG TCTCGGCATG 840
CGTGTCGCCG GGAAAGTCAT CGGCTCTCAT GACAACGGAC TGACGCCTGA GATGTATGCT 900
TCACTTGAAC AACCAACACG TGAC 924

```

(2) 配列番号 1 5 の配列の情報

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ : 308 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 蛋白質

(xi) 配列 : SEQ ID NO: 15:

```

Met Asn Thr Ile Ala Val Ile Gly Lys Val Phe Val Asp Ile Lys Gly
      5                      10                      15
Thr Ser Phe Ala Pro Ile His Lys Asp Ala Lys Asn Val Gly Asp Ile
      20                      25                      30
Ala Phe Ser Asn Gly Gly Thr Gly Arg Asn Val Ala Gln Asn Leu Gly
      35                      40                      45
Val Leu Gly Asn Asp Val Arg Phe Val Ser Thr Val Thr Asn Asp Gln
      50                      55                      60
Ile Gly Ile Gly Val Leu Glu Glu Leu Arg Ser Leu Asn Val Asn Val
      65                      70                      75                      80
Glu His Val Asp Leu Leu Glu Asp Asn Gly Met Gly Met Trp Leu Ala
      85                      90                      95
Val Met Asp Asn Asn Gly Asp Leu Gln Thr Ser Ile Ser Lys Gln Pro
      100                     105                     110
Asp Glu Ala Met Met Glu Gln Cys Ile Leu Arg Arg Ile Asp Thr Val
      115                     120                     125
Phe Ala Glu Ser Thr Ala Val Ala Ile Asp Leu Asp Leu Ser Val Asn
      130                     135                     140
Val Leu Asn Glu Thr Ile Glu Leu Cys Arg Glu Met Lys Leu Pro Leu
      145                     150                     155                     160
Tyr Gly Val Cys Gly His Leu Ser Val Ile Glu Arg Asn Arg His Leu
      165                     170                     175

```

Leu Gln Gly Phe Thr Gly Phe Ile Cys Ser Arg Glu Glu Ala Glu Ile
180 185 190

Leu Ser Asp Met Ser Ile Val Thr Val Asp Asp Ala Leu Arg Val Ala
195 200 205

Glu Val Leu Ala Met Lys Gly Ala Pro Leu Thr Ile Val Thr Met Ser
210 215 220

Glu Leu Gly Ala Val Tyr Val Asp Leu Arg Thr Asn Glu Gln Gly His
225 230 235 240

Val Pro Thr Thr Lys Val Lys Val Ala Asp Ser Thr Gly Ala Gly Asp
245 250 255

Ser Phe Phe Ser Ala Val Ile Ser Glu Leu Met Lys Glu His Ser Ile
260 265 270

Glu Asp Ala Leu Arg Leu Gly Met Arg Val Ala Gly Lys Val Ile Gly
275 280 285

Ser His Asp Asn Gly Leu Thr Pro Glu Met Tyr Ala Ser Leu Glu Gln
290 295 300

Pro Thr Arg Asp

請求の範囲

1. イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を A T P 再生能を有する微生物に導入した形質転換株を、イノシン若しくはグアノシン又はこれらの前駆体、エネルギー供与体、及びリン酸供与体に接触反応させて、反応液中に 5' - イノシン酸又は 5' - グアニル酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする 5' - イノシン酸又は 5' - グアニル酸の製造法。
2. A T P 再生能を有する微生物がコリネバクテリウム属、エシェリヒア属、サッカロミセス属、スタフィロコッカス属及びキャンディダ属からなる群より選ばれる微生物である請求項 1 記載の 5' - イノシン酸又は 5' - グアニル酸の製造法。
3. A T P 再生能を有する微生物がコリネバクテリウム・アンモニアゲネスである請求項 1 記載の 5' - イノシン酸又は 5' - グアニル酸の製造法。
4. イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエキシグオバクテリウム・アセチリカムに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の 5' - イノシン酸又は 5' - グアニル酸の製造法。
5. イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエシェリヒア・コリに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の 5' - イノシン酸又は 5' - グアニル酸の製造法。
6. イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を A T P 再生能を有する微生物に導入した形質転換株。
7. A T P 再生能を有する微生物がコリネバクテリウム属、エシェリヒア属、サッカロミセス属、スタフィロコッカス属及びキャンディダ属からなる群より選ばれる微生物である請求項 6 記載の形質転換株。
8. A T P 再生能を有する微生物がコリネバクテリウム・アンモニアゲネスである請求項 6 記載の形質転換株。

9. イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエキシグオバクテリウム・アセチリカムに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である請求項6～8のいずれか一項に記載の形質転換株。
10. イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエシェリヒア・コリに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である請求項6～8のいずれか一項に記載の形質転換株。
11. コリネバクテリウム・アンモニアゲネスにおいて複製可能であり、かつイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を含む組換えDNA。
12. イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエキシグオバクテリウム・アセチリカムに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である請求項11記載の組換えDNA。
13. イノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がエシェリヒア・コリに由来する遺伝子、又は該遺伝子にハイブリダイズすることができる遺伝子である請求項11記載の組換えDNA。
14. エキシグオバクテリウム・アセチリカムに属する微生物から得ることができ、かつ、以下の性質を有するイノシンーグアノシンキナーゼ活性を有する蛋白質。

1. 作用

リン酸供与体の存在下に、ヌクレオシドにリン酸基を転移し、ヌクレオシドの5'-モノリン酸エステルを生成する。

2. 基質特異性

ヌクレオシド三リン酸の γ 位のリン酸基が、他のヌクレオシドに転移する。

3. 至適pH

7. 7-9. 9

4. pH 安定性

pH 6.7 - 12.1

5. 至適温度

30 - 50°C

6. 金属要求性

マグネシウムイオン、マンガンイオン、コバルトイオン、又は、鉄イオン。

7. 金属イオンによる影響

銅イオン、水銀イオンで強く阻害される。

亜鉛イオン、カドミウムイオンでも阻害される。

8. Km 値

Km 値は、グアノシンに対して 0.03 mM、

イノシンに対して 1 mM、

グアノシンを基質とした場合、ATP に対しては 1.6 mM。

9. 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約 36 キロダルトン。

15. イノシン-グアノシンキナーゼ活性を有し、配列表配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する、又は、該アミノ酸配列の一部においてアミノ酸が削除、置換若しくは追加されている蛋白質。

16. 請求項 14 又は 15 記載の蛋白質をコードする遺伝子。

17. イノシン-グアノシンキナーゼを活性を有する蛋白質をコードし、配列表配列番号 1 に示される塩基配列を有する、又は該塩基配列を有する遺伝子とハイブリダイズすることのできる遺伝子。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N9/12, C12N15/54 // (C12N15/54, C12R1:19) (C12N9/12, C12R1:15) (C12N15/54, C12R1:00)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N9/00-9/99, 15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 39-29858, B1 (Ajinomoto Co., Inc.), December 22, 1964 (22. 12. 64)	1 - 17
A	JP, 42-1186, B1 (Kikkoman Corporation), January 20, 1967 (20. 01. 67) (Family: none)	1 - 17
A	JP, 49-44350, B1 (Kikkoman Corporation), November 27, 1974 (27. 11. 74) (Family: none)	1 - 17
A	JP, 56-82098, A (Ajinomoto Co., Inc.), July 4, 1981 (04. 07. 81) (Family: none)	1 - 17
A	JP, 63-230094, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), September 26, 1988 (26. 09. 88), & EP, 282989, A1	1 - 17
A	Journal of General Microbiology (1989) pages 1263 to 1273	1 - 17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 12, 1996 (12. 06. 96)

Date of mailing of the international search report

June 25, 1996 (25. 06. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N9/12, C12N15/54// (C12N15/54, C12R1:19) (C12N9/12, C12R1:15) (C12N15/54, C12R1:00)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N9/00-9/99, 15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 39-29858, B1 (味の素株式会社) 22. 12月. 1964 (22. 12. 64)	1-17
A	JP, 42-1186, B1 (キッコーマン醤油株式会社) 20. 1月. 1967 (20. 01. 67) (ファミリーなし)	1-17
A	JP, 49-44350, B1 (キッコーマン醤油株式会社) 27. 11月. 1974 (27. 11. 74) (ファミリーなし)	1-17
A	JP, 56-82098, A (味の素株式会社) 4. 7月. 1981 (04. 07. 81) (ファミリーなし)	1-17
A	JP, 63-230094, A (協和醗酵工業株式会社) 26. 9月. 1988 (2	1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 06. 96

国際調査報告の発送日

25.06.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高



4B

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	6. 09. 88) & EP, 282989, A1 Journal of General Microbiology (1989) 第 1263~1273頁	1-17